

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 11 DEC. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2



Remplir impérativement la 2ème page.

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 540 W / 190600

REMISE DES PIÈCES DATE 10 DEC 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0215563 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 10 DEC. 2002		10 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE Monsieur André BOURGOUIN BEAUFOR IPSSEN - S.C.R.A.S. Direction de la Propriété Industrielle 24 rue Erlanger 75781 PARIS CEDEX 16	
Vos références pour ce dossier (facultatif) RS 331 - ER/MM			
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N°	Date
ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/>	Date
Demande de brevet initiale		N°	Date
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Procédé de préparation de l'hétérocarpine recombinante			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date	
		N°	
		Pays ou organisation Date	
		N°	
		Pays ou organisation Date	
		N°	
		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		SOCIETE DE CONSEILS DE RECHERCHES ET D'APPLICATIONS SCIENTIFIQUES (S.C.R.A.S.)	
Prénoms			
Forme juridique		Société par Actions Simplifiée	
N° SIREN		3 . 0 . 8 . 1 . 9 . 7 . 1 . 8 . 5	
Code APE-NAF		7 . 4 . 1 . J	
Adresse	Rue	42 rue du Docteur Blanche	
	Code postal et ville	75016	PARIS
Pays		FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		(33) 01 44 30 43 43	
N° de télécopie (facultatif)		(33) 01 44 30 43 21	
Adresse électronique (facultatif)			



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

REMISE DES PIÈCES DATE 10 DEC 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0215563 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>		RS 331 - ER/MM	
6 MANDATAIRE			
Nom		BOURGOUIN	
Prénom		André	
Cabinet ou Société		BEAUFOR IPSEN - S.C.R.A.S. Direction de la Propriété Industrielle	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		PG 8225	
Adresse	Rue	24 rue Erlanger	
	Code postal et ville	75781	PARIS CEDEX 16
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		(33) 01 44 96 10 10	
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		(33) 01 44 96 13 42	
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		andre.bourgouin@beaufor-ipsen.com	
7 INVENTEUR (S)			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt <i>(joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence)</i> :	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suíte», indiquez le nombre de pages jointes			
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) André BOURGOUIN, Mandataire		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI 	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

Procédé de préparation d'hétérocarpine recombinante

L'invention a pour objet un procédé de préparation d'hétérocarpine recombinante.

L'hétérocarpine est une protéine aux propriétés anti-cancéreuses décrite pour la première fois par la demanderesse dans la demande de brevet PCT WO 02/068461. Cette protéine isolée possède une masse moléculaire d'environ 90,9 kDa, comporte les
5 fragments de séquences peptidiques SEQ. ID. NO. 1, SEQ. ID. NO. 2 et SEQ. ID. NO. 3 (voir la partie de la description réservée à la liste des séquences) et est susceptible d'être obtenue par extraction de cellules de plante *Pilocarpus heterophyllus* cultivées *in vitro* comme décrit dans la demande de brevet susmentionnée. Toutefois, la séquence complète de cette protéine restait inconnue à ce jour dans la mesure où le
10 clonage n'avait pas été effectué.

La présente demande décrit à présent des polynucléotides pouvant servir d'amorce pour le clonage de l'hétérocarpine, l'ADN codant pour l'hétérocarpine, l'ARNm correspondant à l'hétérocarpine, des vecteurs d'expression contenant ledit ARNm, des
15 cellules hôtes transformées ou transfectées avec ces vecteurs de même qu'un procédé de préparation d'hétérocarpine recombinante.

La présente invention a donc d'abord pour objet un polynucléotide isolé comprenant la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 8. De préférence, ledit polynucléotide isolé consiste en la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 8.

Elle a aussi pour objet un polynucléotide anti-sens comprenant la séquence
20 complémentaire à celle dudit polynucléotide isolé comprenant la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 8. De préférence, ledit polynucléotide anti-sens consiste en la séquence complémentaire à la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 8.

L'invention concerne également un polynucléotide isolé comprenant la séquence
25 polynucléotidique SEQ. ID. NO. 8 ou un des fragments de cette dernière, ledit polynucléotide étant tel qu'il code pour un polypeptide ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire. De préférence, ledit polynucléotide isolé est tel qu'il consiste en la séquence polynucléotidique
30 SEQ. ID. NO. 8 ou un des fragments de cette dernière.

En particulier, l'invention concerne à ce titre le polynucléotide isolé de séquence nucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou le polynucléotide isolé de séquence nucléotidique complémentaire à la séquence nucléotidique SEQ. ID. NO. 9.

5 L'hétérocarpine, autrement dit la protéine de séquence SEQ. ID. NO. 10, est codée par le fragment du polynucléotide de séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 8 contenu entre les bases aux positions 115 (codon initiateur ATG codant pour une méthionine) et 2437 (codon stop UAA), i.e. par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9.

10 L'invention concerne donc encore un vecteur d'expression comprenant un polynucléotide isolé comprenant la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 8 ou un des fragments de cette dernière ou bien la séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 8 ou un des fragments de cette dernière, le polypeptide codé par ledit polynucléotide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire. De préférence, ledit vecteur d'expression
15 comprendra la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou la séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9.

L'invention concerne de même une cellule hôte transformée ou transfectée avec ledit vecteur d'expression.

20 L'invention concerne aussi un polypeptide isolé comprenant un polypeptide de séquence SEQ. ID. NO. 14 ou un de ses fragments, ledit polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire. De préférence, ledit polypeptide isolé consistera en un polypeptide de séquence SEQ. ID. NO. 14 ou en un de ses fragments. En particulier, ledit polypeptide possèdera
25 la séquence SEQ. ID. NO. 14.

L'invention a également pour objet un anticorps monoclonal, ou un fragment de liaison de l'antigène de celui-ci, qui fixe spécifiquement un polypeptide isolé tel que décrit précédemment, et en particulier un anticorps monoclonal, ou un fragment de liaison de l'antigène de celui-ci, qui fixe spécifiquement la protéine de séquence SEQ. ID. NO. 10
30 ou la protéine de séquence SEQ. ID. NO. 14.

L'invention concerne aussi, à titre de médicament, un polynucléotide isolé comprenant :

- la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 8 ou un de ses fragments, ou
- la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un de ses fragments,

ledit polynucléotide isolé étant tel qu'il code pour un polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire.

De préférence, le polynucléotide isolé consistera en le polynucléotide de séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 8 ou un de ses fragments, ou en le polynucléotide de séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un de ses fragments.

En particulier, ledit polynucléotide isolé consistera en le polynucléotide de séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 8 ou en le polynucléotide de séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9.

Par ailleurs, ledit polynucléotide isolé utilisé en tant que médicament sera de préférence présent dans un vecteur viral, ledit vecteur viral étant par exemple sélectionné à partir du groupe consistant en un adénovirus, un adénovirus associé, un rétrovirus et un pox virus.

L'invention concerne aussi, à titre de médicament, un polypeptide isolé comprenant un polypeptide de séquence SEQ. ID. NO. 14 ou un de ses fragments, ledit polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire. De préférence, ledit polypeptide isolé consistera en un polypeptide de séquence SEQ. ID. NO. 14 ou en un de ses fragments. En particulier, ledit polypeptide possèdera la séquence SEQ. ID. NO. 14.

L'invention concerne encore, à titre de médicament, un anticorps monoclonal, ou un fragment de liaison de l'antigène de celui-ci, qui fixe spécifiquement un polypeptide isolé comprenant la protéine codée par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un des fragments de cette dernière ou bien par une séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un des fragments de cette dernière, ledit polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire. De préférence, ledit anticorps monoclonal ou ledit fragment de l'antigène de celui-ci fixe spécifiquement un polypeptide isolé consistant en la protéine codée par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un des fragments de cette dernière ou bien par une séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un des fragments de cette dernière. Plus préférentiellement encore, ledit anticorps monoclonal ou ledit fragment de l'antigène de celui-ci fixe spécifiquement un polypeptide isolé consistant en la protéine codée par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou par une séquence complémentaire de la

séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 (autrement dit la protéine de séquence SEQ. ID. NO. 10).

Un autre objet de l'invention sera une composition pharmaceutique comprenant, à titre de principe actif, un polynucléotide isolé comprenant :

- 5 - la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 8 ou un de ses fragments, ou
- la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un de ses fragments,

ledit polynucléotide isolé étant tel qu'il code pour un polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire,

- 10 avec un ou des excipients pharmaceutiquement acceptables.

De préférence, le polynucléotide isolé servant de principe actif consistera en le polynucléotide de séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 8 ou un de ses fragments ou en le polynucléotide de séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un de ses fragments.

- 15 En particulier, le polynucléotide isolé servant de principe actif consistera en le polynucléotide de séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 8 ou en le polynucléotide de séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9.

- Ledit polynucléotide isolé incorporé dans une composition pharmaceutique selon l'invention sera de préférence présent dans un vecteur viral, ledit vecteur viral étant par
20 exemple sélectionné à partir du groupe consistant en un adénovirus, un adénovirus associé, un rétrovirus et un pox virus.

- L'invention concerne aussi une composition pharmaceutique comprenant un polypeptide isolé comprenant un polypeptide de séquence SEQ. ID. NO. 14 ou un de ses fragments, ledit polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou
25 biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire. De préférence, ledit polypeptide isolé consistera en un polypeptide de séquence SEQ. ID. NO. 14 ou en un de ses fragments. En particulier, ledit polypeptide possèdera la séquence SEQ. ID. NO. 14.

- L'invention aura de plus pour objet une composition pharmaceutique comprenant un
30 anticorps monoclonal, ou un fragment de liaison de l'antigène de celui-ci, qui fixe spécifiquement un polypeptide isolé comprenant au moins un fragment de la protéine codée par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou par une séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9, ledit polypeptide

- isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire, ladite composition comprenant par ailleurs un ou des excipients pharmaceutiquement acceptables. De préférence, ladite composition pharmaceutique selon l'invention sera telle qu'elle comprenne un anticorps monoclonal, ou un fragment de liaison de l'antigène de celui-ci, qui fixe spécifiquement un polypeptide isolé consistant en la protéine codée par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un des fragments de cette dernière ou bien par une séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un des fragments de cette dernière.
- 10 En particulier, l'invention concernera une composition pharmaceutique comprenant un anticorps monoclonal, ou un fragment de liaison de l'antigène de celui-ci, qui fixe spécifiquement la protéine codée par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou par la séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 (autrement dit la protéine de séquence SEQ. ID. NO. 10) avec un ou des excipients pharmaceutiquement acceptables.
- 15

Un autre objet de l'invention est l'utilisation d'un polynucléotide isolé comprenant :

- la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 8 ou un de ses fragments, ou
- la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un de ses fragments,

ledit polynucléotide isolé étant tel qu'il code pour un polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire, pour préparer un médicament destiné à traiter une maladie proliférative.

20

De préférence, le polynucléotide isolé utilisé consistera en le polynucléotide de séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 8 ou un de ses fragments ou en le polynucléotide de séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un de ses fragments.

25

En particulier, le polynucléotide isolé utilisé consistera en le polynucléotide de séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 8 ou en le polynucléotide de séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9.

Ledit polynucléotide isolé utilisé est de préférence présent dans un vecteur viral, ledit vecteur viral étant par exemple sélectionné à partir du groupe consistant en un adénovirus, un adénovirus associé, un rétrovirus et un pox virus.

30

La présente invention concerne également l'utilisation d'un polypeptide isolé comprenant un polypeptide de séquence SEQ. ID. NO. 14 ou un de ses fragments, ledit

polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire, pour préparer un médicament destiné à traiter une maladie proliférative. De préférence, ledit polypeptide isolé consistera en un polypeptide de
5 séquence SEQ. ID. NO. 14 ou en un de ses fragments. En particulier, ledit polypeptide possèdera la séquence SEQ. ID. NO. 14.

Alternativement, toujours selon la présente invention, un anticorps monoclonal, ou un fragment de liaison de l'antigène de celui-ci, qui fixe spécifiquement un polypeptide isolé comprenant la protéine codée par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9
10 ou un des fragments de cette dernière ou bien par une séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un des fragments de cette dernière, ledit polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire, pourra être utilisé pour préparer un
15 médicament destiné à traiter une maladie proliférative. De préférence, ledit anticorps monoclonal ou ledit fragment de l'antigène de celui-ci fixera spécifiquement un polypeptide consistant en la protéine codée par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un des fragments de cette dernière ou bien par une séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un des fragments
20 de cette dernière.

En particulier, un anticorps monoclonal, ou un fragment de liaison de l'antigène de celui-ci, qui fixe spécifiquement un polypeptide isolé codé par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou par la séquence complémentaire à la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 (autrement dit, un anticorps monoclonal, ou un
25 fragment de liaison de l'antigène de celui-ci, qui fixe spécifiquement la protéine de séquence SEQ. ID. NO. 10), pourra être utilisé pour préparer un médicament destiné à traiter une maladie proliférative.

Selon des variantes préférées des utilisations susmentionnées, la maladie proliférative à traiter par le polypeptide ou le polynucléotide décrits précédemment sera un cancer.
30 Selon des variantes encore plus préférées, le cancer sera choisi parmi le groupe consistant en le cancer de la prostate, le cancer du sein, le cancer du poumon (et en particulier le cancer du poumon à petites cellules) et le cancer colorectal. Seront encore plus particulièrement préférés le cancer du sein et le cancer du poumon à petites cellules.

35 L'invention offre de plus une méthode de préparation d'un polypeptide isolé comprenant la protéine codée par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou

SEQ. ID. NO. 13 ou un des fragments de cette dernière ou bien par une séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un des fragments de cette dernière, ledit polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire, ladite méthode de
5 préparation comprenant les étapes successives suivantes :

- (a) culture, dans des conditions convenables pour obtenir l'expression dudit polypeptide d'une cellule hôte transformée ou transfectée avec un vecteur d'expression comprenant un polynucléotide isolé comprenant la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou
10 SEQ. ID. NO. 13, la séquence complémentaire à la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou SEQ. ID. NO. 13 ou encore un des fragments de ces dernières, ledit polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire, et
- 15 (b) isolement du polypeptide à partir des cultures de cellules hôtes.

De préférence, ladite méthode de préparation concernera la préparation d'un polypeptide isolé consistant en la protéine codée par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un des fragments de cette dernière ou bien par une séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un des fragments
20 de cette dernière, ledit polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire, ladite méthode de préparation comprenant les étapes successives suivantes :

- (a) culture, dans des conditions convenables pour obtenir l'expression dudit polypeptide
25 d'une cellule hôte transformée ou transfectée avec un vecteur d'expression comprenant un polynucléotide isolé comprenant la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou SEQ. ID. NO. 13, la séquence complémentaire à la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou SEQ. ID. NO. 13 ou encore un des fragments de ces dernières, ledit polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique
30 caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire, et
- (b) isolement du polypeptide à partir des cultures de cellules hôtes.

En particulier, ladite méthode aura pour objet la préparation du polypeptide isolé codé par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou SEQ. ID. NO. 13 ou par la
35 séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou

SEQ. ID. NO. 13 (autrement dit, la préparation de la protéine de séquence SEQ. ID. NO. 10).

Selon une variante encore plus préférée de ladite méthode, celle-ci concernera la préparation de la protéine de séquence SEQ. ID. NO. 10 et comprendra les étapes suivantes :

- (a) culture, dans des conditions convenables pour obtenir l'expression dudit polypeptide d'une cellule hôte transformée ou transfectée avec un vecteur d'expression comprenant un polynucléotide isolé comprenant la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou SEQ. ID. NO. 13 ou la séquence complémentaire à la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou SEQ. ID. NO. 13, ledit polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire, et
- (b) isolement du polypeptide à partir des cultures de cellules hôtes.

La présente invention offre encore une méthode pour l'identification de composés susceptibles de fixer le GHRH humain et de moduler la prolifération cellulaire, laquelle comprend les étapes successives suivantes :

- (a) mise en contact de chaque composé candidat, dans des conditions et pendant un temps suffisant pour permettre à l'agent candidat de se fixer au polypeptide, avec un polypeptide isolé comprenant :
 - soit un fragment de la protéine codée par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou par une séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9,
 - soit un fragment de la protéine codée par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 13 ou par une séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 13,

ledit polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire, et

- (b) détection de la fixation de chaque composé candidat audit polypeptide et identification, parmi les composés candidats, des composés susceptibles de fixer le GHRH humain et de moduler la prolifération cellulaire.

En particulier, ladite méthode pour l'identification de composés susceptibles de fixer le GHRH humain et de moduler la prolifération cellulaire comprendra, dans son étape (a), la mise en contact de chaque composé candidat, dans des conditions et pendant un

temps suffisant pour permettre à l'agent candidat de se fixer au polypeptide, avec le polypeptide isolé codé par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou par la séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 (autrement dit, avec la protéine de séquence SEQ. ID. NO. 10).

- 5 Une méthode alternative pour l'identification de composés susceptibles de fixer le GHRH humain et de moduler la prolifération cellulaire comprend les étapes successives suivantes :

- (a) mise en contact de chaque composé candidat, dans des conditions et pendant un temps suffisant pour permettre à l'agent candidat et à la cellule d'interagir, avec une
10 cellule capable d'exprimer un polypeptide isolé comprenant :

- soit un fragment de la protéine codée par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou par une séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9,
- soit un fragment de la protéine codée par la séquence polynucléotidique
15 SEQ. ID. NO. 13 ou par une séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 13,

ledit polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et de moduler la prolifération cellulaire, et

- 20 (b) détermination de l'effet de chaque composé candidat sur la concentration cellulaire en polypeptide et identification, parmi les composés candidats, des composés susceptibles de fixer le GHRH humain et de moduler la prolifération cellulaire.

- En particulier, ladite méthode alternative comprendra, dans son étape (a), la mise en contact de chaque composé candidat, dans des conditions et pendant un temps suffisant
25 pour permettre à l'agent candidat et à la cellule d'interagir, avec une cellule capable d'exprimer le polypeptide isolé codé par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou par la séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 (autrement dit, une cellule capable d'exprimer la protéine de séquence SEQ. ID. NO. 10).

- 30 Selon des modes d'exécution préférés des méthodes d'identification de composés susceptibles de fixer le GHRH humain et de moduler la prolifération cellulaire décrites ci-dessus, les composés candidats proviendront de bibliothèques de petites molécules issues de programmes de chimie combinatoire.

Les propriétés pharmacologiques obtenues pour les polynucléotides et polypeptides selon l'invention rendent ces derniers aptes à une utilisation pharmaceutique. En effet, les polypeptides isolés comprenant :

- soit un fragment de la protéine codée par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou par une séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9,
 - soit un fragment de la protéine codée par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 13 ou par une séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 13,
- 10 qui ont au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire, ainsi que les polynucléotides codant pour lesdits polypeptides, peuvent, selon l'invention, être administrés à des patients cancéreux afin de ralentir la progression de leurs tumeurs ou de faire régresser lesdites tumeurs.
- 15 Dans les méthodes ci-dessus, la protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire pourra en particulier être le polypeptide isolé codé par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou par la séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 (autrement dit, la protéine de séquence SEQ. ID. NO. 10).
- 20 Enfin, l'invention concerne les polynucléotides de séquence SEQ. ID. NO. 4, SEQ. ID. NO. 5, SEQ. ID. NO. 11 et SEQ. ID. NO. 12, lesquels peuvent notamment être utilisés en tant qu'amorce dans les réactions de PCR du clonage de l'hétérocarpine.

Les différents éléments évoqués ci-dessus deviendront évidents pour l'homme du métier une fois faite la lecture de la description plus détaillée des différents aspects de l'invention.

Description détaillée des différents aspects de l'invention

Comme mentionné ci-dessus, la présente invention est généralement dirigée vers des produits et des méthodes destinés à moduler la croissance cellulaire et à traiter le cancer. La présente invention est basée, en partie, sur l'identification de « séquences associées à la modulation de la prolifération cellulaire » qui sont des séquences polypeptidiques et polynucléotidiques associées à la modulation de la prolifération cellulaire. De telles molécules d'ADNc peuvent être préparées à partir de préparations d'ARN ou d'ARNm

en utilisant les techniques standard, comme la transcription inverse. De manière similaire, une protéine ou un polypeptide associé à la différenciation comprend la séquence codée par un ARNm associé à la différenciation cellulaire.

5 Les compositions pharmaceutiques décrites ici peuvent inclure un ou plusieurs polypeptides, séquences d'acides nucléiques et/ou anticorps. Les polypeptides de la présente invention comprennent au moins une portion de la protéine ou un variant de celle-ci fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire. Les séquences d'acides nucléiques de la présente invention comprennent une
10 séquence d'ADN ou d'ARN qui code au moins pour une portion d'un tel polypeptide ou qui est complémentaire à une telle séquence codante.

Les anticorps sont des protéines du système immunitaire ou des fragments de fixation à l'antigène de celui-ci, qui sont capables de fixer une portion des polypeptides décrits ci-dessus.

Polynucléotides, polypeptides et protéines selon l'invention :

15 La présente invention a en particulier pour objet les polynucléotides de séquence SEQ. ID. NO. 8, SEQ. ID. NO. 9 ou SEQ. ID. NO. 13 ainsi que le polypeptide ou la protéine de séquence SEQ. ID. NO. 14.

L'invention comprend également les polynucléotides possédant des séquences polynucléotidiques homologues au moins à 75 %, de préférence au moins à 85 % et
20 encore plus préférentiellement au moins à 90 % voire 95 %, aux séquences des polynucléotides décrits plus haut, notamment aux séquences SEQ. ID. NO. 8, SEQ. ID. NO. 9 et SEQ. ID. NO. 13. Cela s'applique également *mutatis mutandis* aux autres polynucléotides, polypeptides et protéines faisant partie de l'invention, et notamment à la protéine de séquence SEQ. ID. NO. 14.

25 Le degré d'homologie exprimé en % est calculé comme suit :

$$100 - 100 \times (N'/N)$$

avec N' représentant le nombre de nucléotides ou d'acides aminés modifiés par rapport à la séquence SEQ. ID. NO. 8, SEQ. ID. NO. 9, SEQ. ID. NO. 10, SEQ. ID. NO. 13 ou
30 SEQ. ID. NO. 14 et N le nombre de nucléotides de la séquence SEQ. ID. NO. 8, SEQ. ID. NO. 9, SEQ. ID. NO. 10, SEQ. ID. NO. 13 ou SEQ. ID. NO. 14.

Selon l'invention, les séquences polynucléotidiques qui codent pour les polypeptides ou protéines de l'invention, et des fragments ou des protéines de fusion de ces polypeptides

ou protéines, peuvent être utilisées pour générer des molécules d'ADN recombinant qui dirigent l'expression de ces polypeptides ou protéines, ou d'une portion active de ceux-ci, dans des cellules hôtes appropriées. Alternativement, des séquences polynucléotidiques qui s'hybrident avec des portions des séquences de polynucléotides selon l'invention peuvent également être utilisées dans des essais d'hybridation d'acides nucléiques, Southern blot, Northern blot, etc.

A cause de la dégénérescence du code génétique, d'autres séquences d'ADN codant substantiellement pour la séquence en acides aminés des polypeptides ou protéines de l'invention peuvent être utilisées pour le clonage et l'expression desdits polypeptides ou protéines. De telles séquences d'ADN incluent celles capables d'hybrider les séquences polynucléotidiques des polynucléotides de l'invention dans certaines conditions de stringence qui peuvent être ajustées de plusieurs manières. Par exemple, lors de réaction de polymérisation en chaîne (PCR), la température à laquelle s'hybrident les amorces à la matrice ou les concentrations de $MgCl_2$ dans le tampon réactionnel, peuvent être ajustés. Lors de l'utilisation de fragments d'ADN radio-marqués, ou d'oligonucléotides pour sonder des membranes, la stringence peut être ajustée en changeant les forces ioniques des solutions de lavage ou en contrôlant avec précaution la température de lavage.

De manière préférentielle, une telle séquence nucléotidique homologue s'hybride spécifiquement avec la séquence complémentaire à la séquence SEQ. ID. NO. 8, SEQ. ID. NO. 9 ou SEQ. ID. NO. 13 dans des conditions stringentes (ou des conditions de stringence « fortes »). Les paramètres définissant les conditions de stringence dépendent de la température à laquelle 50 % des brins appariés se séparent (T_m).

Pour les séquences comprenant plus de 30 bases, et d'après Sambrook et coll. (*Molecular cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 1989), T_m est définie par la relation :

$$T_m = 81,5 + 0,41 \times (\% \text{ G+C}) + 16,6 \times \log[\text{cations}] - 0,63 \times (\% \text{ formamide}) - (600 / \text{nombre de bases})$$

Pour la présente invention, les conditions de stringence seront dites « fortes » lorsque l'on utilise une température d'hybridation de 10° C en dessous de T_m et des tampons d'hybridation contenant une solution 6 x SSC (chlorure de sodium 0,9 M et citrate de sodium 0,09 M). Dans de telles conditions, les polynucléotides de séquences aspécifiques ne s'hybrideront pas avec le polynucléotide de la séquence complémentaire à la séquence SEQ. ID. NO. 8, SEQ. ID. NO. 9 ou SEQ. ID. NO. 13.

Des séquences d'ADN altérées qui peuvent être utilisées en accord avec la présente invention incluent des délétions, des additions ou des substitutions de différents résidus nucléotidiques résultant dans une séquence qui code le même produit du gène ou de fonction équivalente. Le produit du gène peut également contenir des délétions, des additions ou des substitutions de résidus d'acides aminés dans les séquences des protéines de l'invention, qui résultent dans des changements dits silencieux, produisant ainsi des polypeptides et protéines de fonction équivalente.

De telles substitutions en acides aminés peuvent être réalisés sur la base de la polarité, de la charge, de la solubilité, de l'hydrophobicité, de l'hydrophilicité, et/ou de la nature amphipatique des résidus impliqués.

Par exemple, des acides aminés chargés négativement incluent l'acide aspartique et l'acide glutamique, des acides aminés chargés positivement incluent la lysine et l'arginine, des acides aminés avec des groupements polaires ayant des valeurs d'hydrophobicité voisines incluent la leucine, l'isoleucine, la valine ; la glycine, l'alanine ; l'asparagine, la glutamine ; la sérine, la thréonine ; la phénylalanine, la tyrosine.

Les séquences d'ADN de la présente invention peuvent être modifiées pour altérer les séquences des polynucléotides selon l'invention pour de nombreuses raisons incluant de manière non limitative des altérations qui modifient le processus et l'expression du produit du gène. Par exemple, des mutations peuvent être introduites en utilisant des techniques bien connues de l'homme du métier, par exemple la mutagenèse dirigée, l'insertion de nouveaux sites de restriction, l'altération des glycosylations, la phosphorylation, etc.

En particulier, dans certains systèmes d'expression comme la levure, la cellule hôte peut sur-glycosyler le produit du gène. Dans un tel système, il est préférable d'altérer les séquences polynucléotidiques pour éliminer les sites de glycosylation. Dans l'étendue de la divulgation de la présente invention figurent également des séquences polynucléotidiques modifiées liées à des séquences hétérologues pour coder une protéine de fusion. La protéine de fusion (qui peut être par exemple la protéine de séquence SEQ. ID. NO. 14) peut être modifiée pour contenir un site de clivage localisé entre la séquence de la protéine selon l'invention (par exemple la séquence SEQ. ID. NO. 10) et la séquence de la protéine hétérologue, de telle sorte que la séquence de la protéine selon l'invention puisse être clivée de la partie hétérologue.

Polynucléotides codant pour des polypeptides associés à la modulation de la prolifération cellulaire :

Tout polynucléotide qui code pour un polypeptide ou une portion ou un variant de celui-ci comme décrit ici fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire, est couvert par la présente invention. De tels polynucléotides
5 peuvent être simple brin (codant ou anti-sens) ou double brin et peuvent être de l'ADN (génomique, ADNc ou synthétique) ou des molécules d'ARN.

Les polynucléotides codant pour des polypeptides fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire peuvent être préparés en utilisant
10 n'importe quelle technique disponible pour l'homme du métier. Par exemple, un tel polynucléotide peut être amplifié *via* une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à partir d'ADNc préparé à partir de cellules. Pour cette approche, des amorces spécifiques peuvent être dessinées et commandées ou synthétisées ; ces amorces sont basées sur la séquence dudit polynucléotide. Une portion amplifiée peut ensuite être utilisée pour
15 isoler le gène complet à partir d'une banque d'ADN génomique ou à partir d'une banque d'ADNc de n'importe quelle cellule ou n'importe quel tissu, grâce à des techniques bien connues de l'homme du métier et brièvement rappelées ci-dessous. Alternativement, un gène complet peut être construit à partir de plusieurs fragments de PCR. Les molécules d'ADNc codant pour une protéine fixant le GHRH humain et étant
20 associée à la modulation de la prolifération cellulaire, ou une portion de celle-ci, peuvent également être préparées en criblant une banque d'ADNc obtenue par exemple à partir d'ARNm de cellules ou de tissus. De telles librairies peuvent être disponibles dans le commerce ou peuvent être préparées en utilisant les techniques classiques (cf. Sambrook et coll., *Molecular cloning : A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor
25 Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

Alternativement, d'autres techniques de criblage bien connues par l'homme du métier peuvent être employées.

Une molécule d'ADNc codant pour un polypeptide fixant le GHRH humain et étant associé à la modulation de la prolifération cellulaire peut être séquencée en utilisant les
30 techniques classiques utilisant des enzymes comme le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I, la Séquenase X (US Biochemical Corp., Cleveland, OH, Etats-Unis), la Taq polymérase (Perkin Elmer, Foster City, CA, Etats-Unis), la polymérase thermostable T7 (Amersham, Chicago, IL, Etats-Unis) ou une combinaison de polymérases recombinantes et d'exonucléases à activité de relecture comme le système
35 d'amplification Elongase (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, Etats-Unis). Un système de

séquençage automatique peut être utilisé à l'aide des instruments disponibles chez des fournisseurs commerciaux comme Perkin Elmer et Pharmacia.

La séquence partielle d'un ADNc peut être utilisée pour identifier une séquence polynucléotidique qui code pour la protéine complète associée à la modulation de la
5 prolifération cellulaire en utilisant des techniques classiques bien connues de l'homme du métier. Parmi ces techniques, une librairie d'ADNc est criblée en utilisant une ou plusieurs sondes polynucléotidiques en utilisant les propriétés de recombinaison de RecA (ClonCapture cDNA Selection Kit, Clontech Laboratories, Etats-Unis).

Pour les techniques d'hybridation, une séquence partielle peut être radiomarquée (par
10 exemple par translation de coupure ou par marquage des extrémités en utilisant du ^{32}P ou du ^{33}P) en utilisant des techniques classiques. Une librairie de bactéries ou de bactériophages est ensuite criblée par hybridation sur des filtres contenant les colonies bactériennes dénaturées (ou les empreintes contenant les plaques de phages) avec la sonde marquée (cf. Sambrook et coll., *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, Cold
15 Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Les colonies positives ou plaques sont ensuite sélectionnées et amplifiées et l'ADN est isolé pour des analyses futures.

La séquence complète peut ensuite être déterminée en utilisant des techniques standard. Les séquences chevauchantes sont ensuite assemblées en une séquence unique continue.
20 Une molécule d'ADNc complète peut être générée par ligature des fragments d'intérêt en utilisant des techniques classiques.

Alternativement, il existe de nombreuses techniques basées sur l'amplification pour l'obtention d'une séquence codante complète à partir d'une séquence partielle d'ADNc. Parmi elles, l'amplification est généralement réalisée via PCR. L'ensemble des kits
25 disponibles dans le commerce peut être utilisé pour les étapes d'amplification. Les amorces peuvent être dessinées en utilisant, par exemple, des logiciels bien connus dans le métier. Les amorces nucléotidiques sont de préférence des molécules de 20 à 30 nucléotides ayant un contenu en guanine et cytosine d'au moins 50 % et qui s'hybrident avec la séquence cible à des températures comprises entre 50 et 72° C. La
30 région amplifiée peut être séquencée comme décrit ci-dessus et les séquences chevauchantes assemblées en une séquence continue.

Parmi les approches alternatives, des séquences adjacentes à la séquence partielle peuvent être retrouvées par amplification avec une amorce de la séquence de liaison et une amorce spécifique d'une région connue. Les séquences amplifiées sont ensuite
35 soumises à un second cycle d'amplification.

Des techniques additionnelles incluent la PCR de capture (Lagerstrom et coll., *PCR Methods Applic.* (1991), 1, 111-19) et la PCR progressive (Parker et coll., *Nucl. Acids. Res.* (1991), 19, 3055-60). D'autres méthodes utilisant l'amplification peuvent également être employées pour l'obtention d'une séquence complète d'ADNc.

5 Il est possible d'obtenir une séquence d'ADNc complète en analysant les séquences déposées dans les bases publiques « Expressed Sequence Tags » (ESTs) disponibles à partir de GenBank. Des recherches de recouvrement des ESTs peuvent être réalisées en utilisant des programmes informatiques bien connus de l'homme du métier (par exemple NCBI BLAST) et de tels ESTs peuvent être utilisés pour générer une séquence
10 complète continue.

Les variants des séquences polynucléotidiques décrites plus haut (notamment des séquences SEQ. ID. NO. 8, SEQ. ID. NO. 9 et SEQ. ID. NO. 13) sont également inclus dans le champ de la présente invention. Les variants polynucléotidiques peuvent contenir une ou plusieurs substitutions, délétions ou insertions (cf. aussi supra dans la
15 partie intitulée « Polynucléotides, polypeptides et protéines selon l'invention »).

Une portion de la séquence complémentaire de la séquence codante (i.e. un polynucléotide anti-sens) peut également être utilisée comme sonde ou comme modulateur de l'expression génique. Les construits d'ADNc pouvant être transcrits en ARN anti-sens peuvent être introduits dans des cellules ou dans des tissus pour faciliter
20 la production d'ARN anti-sens. Un polynucléotide anti-sens peut être utilisé, comme décrit ici, pour inhiber l'expression d'un gène associé à la modulation de la prolifération cellulaire. La technologie anti-sens peut être utilisée pour contrôler l'expression génique en formant une triple-hélice, qui compromet la capacité de la double hélice à s'ouvrir suffisamment pour la fixation des polymérases, des facteurs de transcription ou des
25 molécules de régulation (cf. Gee et coll. dans Huber et Carr, *Molecular and Immunologic Approaches* (1994), Futura Publishing Co., Mt. Kisco, NY). Alternativement, une molécule anti-sens peut être utilisée pour s'hybrider avec une région de contrôle du gène (par exemple un promoteur ou un site d'initiation de la transcription) et bloquer la transcription du gène, ou bloquer la traduction en inhibant la
30 fixation des ribosomes au transcrit.

Les polynucléotides peuvent ensuite être modifiés pour augmenter leur stabilité *in vivo*. Des modifications possibles incluent (mais ne sont pas limitées à) : l'addition de séquences aux extrémités 5' et/ou 3' ; l'utilisation de phosphorothioate ou de 2' O-méthyle plutôt que des liaisons phosphodiesterase dans le squelette ; et/ou
35 l'introduction de bases comme l'inosine, la quéosine et la wybutosine de même que

l'acétyladénine, la méthylthioadénine et d'autres formes modifiées de l'adénine, la cytidine, la guanine, la thymine et l'uridine.

D'autres variations des polynucléotides de la présente invention ont par ailleurs déjà été décrites précédemment dans la partie intitulée « Polynucléotides, polypeptides et protéines selon l'invention ».

Les séquences de nucléotides comme décrites dans la présente invention peuvent être jointes à d'autres séquences nucléotidiques en utilisant des techniques établies d'ADN recombinant. Par exemple, un polynucléotide peut être cloné dans un large panel de vecteurs d'expression, incluant des plasmides, des phagemides, des dérivés du phage lambda et des cosmides. Les vecteurs d'intérêt particulier incluent les vecteurs d'expression, des vecteurs de répllication et des vecteurs de séquençage. En général, un vecteur contient une origine de répllication fonctionnelle dans au moins un organisme, des sites de restriction endonucléasiques convenables et un ou plusieurs marqueurs de sélection. La présence d'autres éléments dépendra de l'utilisation spécifique souhaitée par l'homme du métier qui sélectionnera les caractéristiques du vecteur d'expression en fonction de ses besoins et des techniques disponibles.

Les polynucléotides peuvent être formulés pour entrer dans la cellule et exprimer le polypeptide correspondant. De telles formulations sont particulièrement utiles en thérapeutique comme décrit ci-après.

Les hommes du métier apprécieront qu'il existe plusieurs moyens pour exprimer un polynucléotide dans une cellule cible, et que n'importe quelle technique adéquate peut être employée. Par exemple, un polynucléotide peut être incorporé dans un vecteur viral comme un adénovirus ou un rétrovirus (mais aussi dans d'autres). Des techniques pour incorporer de l'ADN dans de tels vecteurs sont bien connues de l'homme de l'art. Un vecteur rétroviral peut transférer ou incorporer un gène pour un marqueur de sélection et/ou une entité de ciblage comme un gène codant pour le ligand d'un récepteur spécifique d'une cellule cible, afin de rendre le vecteur cible-spécifique.

D'autres formulations pour les polynucléotides incluent les systèmes de dispersion colloïdaux comme des complexes macromoléculaires, nano-capsules, microsphères, billes, et des systèmes basés sur l'utilisation des lipides incluant les émulsions huile/eau, micelles, micelles mixtes et liposomes. Le système colloïdal préféré pour une utilisation de délivrance du produit *in vitro* et *in vivo* est le liposome (i.e. une vésicule membranaire artificielle).

Polypeptides fixant le GHRH humain et modulant la prolifération cellulaire :

Dans l'étendue de la divulgation, les polypeptides de la présente invention comprennent au moins une portion de la protéine associée à la modulation de la prolifération cellulaire ou d'un variant de celle-ci, ladite portion étant immunologiquement et/ou biologiquement active. De tels polypeptides peuvent avoir n'importe quelle longueur, incluant la protéine complète, un oligopeptide (i.e. consistant en un nombre relativement limité d'acides aminés, comme 8-10 résidus, joints par des liaisons peptidiques) ou un peptide de taille intermédiaire. Un polypeptide peut également comprendre des séquences additionnelles.

De manière similaire, un polypeptide est « biologiquement actif » s'il possède une ou plusieurs fonctions structurales, régulatrices et/ou biochimiques à partir de la protéine native associée à la fixation du GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire.

La présence d'une activité biologique peut être déterminée selon des méthodes bien connues de l'homme du métier. Toutefois, par définition dans le cadre de la présente invention, un polypeptide sera considéré comme « ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire » dès lors que sa concentration inhibitrice CI_{50} mesurée dans les conditions décrites dans l'exemple 6 de la présente demande sera inférieure ou égale à 10 nM (et de préférence inférieure ou égale à 1 nM).

Par exemple, des études de comparaison de séquences peuvent indiquer une activité biologique particulière de la protéine. Les essais tendant à évaluer ladite activité peuvent alors être mis en œuvre sur la base d'essais déjà connus dans le métier. Certaines portions et d'autres variants de telles protéines devraient également montrer cette propriété selon un test *in vitro* ou *in vivo*.

Comme déjà mentionné, les polypeptides selon la présente invention peuvent comprendre une ou plusieurs portions d'un variant de la protéine endogène où la portion est immunologiquement et/ou biologiquement active (i.e. la portion présente une ou plusieurs caractéristiques antigéniques, immunogéniques et/ou biologique de la protéine complète). De préférence, une telle portion est au moins aussi active que la protéine totale lors d'essais permettant la détection de telles propriétés. Un polypeptide « variant » est un polypeptide qui diffère de la protéine native par des substitutions, des insertions, des délétions et/ou des modifications en acides aminés. Certains variants

contiennent des substitutions conservatrices. « Une substitution conservatrice » est une substitution dans laquelle un acide aminé est substitué par un autre acide aminé ayant les mêmes propriétés, comme celles déterminées par l'homme du métier qui n'attend aucun changement dans la structure secondaire, ainsi que dans la nature hydrophatique du polypeptide. Les substitutions d'acide aminé peuvent généralement être réalisées sur la base de similarité de polarité, de charge, de solubilité, d'hydrophobicité, d'hydrophilicité, et/ou de la nature amphipathique des résidus. Par exemple, des acides aminés chargés négativement incluent l'acide aspartique et l'acide glutamique ; des acides aminés chargés positivement incluent la lysine et l'arginine ; et des acides aminés non chargés polaires ayant des valeurs d'hydrophobicité similaire incluent la leucine, l'isoleucine et la valine ; la glycine et l'alanine ; l'asparagine et la glutamine ; la sérine, la thréonine, la phénylalanine et la tyrosine. D'autres groupes d'acides aminés qui peuvent représenter des changements conservateurs sont notamment les suivants : (1) Ala, Pro, Gly, Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Thr ; (2) Cys, Ser, Tyr, Thr (3) Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe ; (4) Lys, Arg, His ; et (5) Phe, Tyr, Trp, His. Un variant peut également, ou alternativement, contenir des changements non conservateurs.

Des variants faisant partie de cette invention incluent également des polypeptides dans lesquels la structure primaire de la protéine native est modifiée par formation de conjugués covalents ou pas avec d'autres polypeptides ou des structures chimiques comme des groupes lipidiques ou des groupes glycosyle, ou phosphate acétyle.

La présente invention inclut également des polypeptides avec ou sans motifs de glycosylation. Les polypeptides exprimés dans des systèmes d'expression de levure ou de cellules de mammifères peuvent être, en termes de poids moléculaire et de schéma de glycosylation, similaires à ou légèrement différents de la molécule native selon le système d'expression utilisé.

L'expression d'ADN chez la bactérie comme *E. Coli* conduit à des molécules non-glycosylées. Les sites de N-glycosylation des protéines eucaryotes sont caractérisés par le triplet d'acides aminés Asn-A1-Z où A1 est n'importe quel acide aminé excepté Pro, et Z est une sérine ou une thréonine.

D'autres variations des polypeptides et protéines de la présente invention ont par ailleurs déjà été décrites précédemment dans la partie intitulée « Polypeptides et polynucléotides selon l'invention ».

Pour préparer un variant polypeptidique, des techniques standard de mutagenèse, comme la mutagenèse dirigée en utilisant un oligonucléotide dirigé, peuvent être utilisées.

En général, n'importe quel vecteur d'expression connu de l'homme du métier peut être employé pour exprimer des polypeptides recombinants de cette invention. L'expression peut être obtenue dans n'importe quelle cellule hôte appropriée qui a été transformée ou transfectée avec un vecteur d'expression contenant une séquence d'ADN qui code pour le polypeptide recombinant. Des cellules hôtes convenables incluent des cellules procaryotes, d'eucaryotes supérieurs ou de levure. De préférence, les cellules hôtes employées sont *E. Coli*, des cellules de levure ou des cellules de mammifères comme COS, CHO, HEK-293, MCF7 (cellules tumorales humaines isolées à partir d'un carcinome mammaire) ou DU 145 (cellules tumorales humaines isolées à partir d'un cancer de la prostate).

Certaines portions et d'autres variants peuvent également être générés par des moyens synthétiques en utilisant des techniques bien connues de l'homme de l'art. Par exemple, des portions et autres variants ayant moins de 500 acides aminés, de préférence moins de 100 acides aminés et plus préférentiellement moins de 50 acides aminés peuvent être synthétisés par voie chimique. Les polypeptides peuvent être synthétisés en utilisant des techniques de synthèse sur phase solide disponibles commercialement, comme la méthode de synthèse sur résine de Merrifield où les acides aminés sont séquentiellement ajoutés à une chaîne d'acides aminés en cours de synthèse (cf. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* (1963), 85, 2149-2146). De nombreuses autres techniques de synthèse sur phase solide sont également disponibles (par exemple la méthode de Roberge et coll., *Science* (1995), 269, 202-204). Des équipements pour la synthèse automatique de polypeptides sont commercialement disponibles chez des fournisseurs comme Applied Biosystems, Inc. (Foster City, CA, Etats-Unis) ; la synthèse des polypeptides peut alors être réalisée en suivant les recommandations du constructeur.

25 Polynucléotides ou polypeptides isolés :

En général, les polypeptides et polynucléotides décrits dans la présente invention sont isolés. Un polypeptide ou un polynucléotide « isolé » est un polynucléotide ou un peptide enlevé de son environnement original. Par exemple, une protéine naturelle est isolée si elle est séparée du matériel biologique avec lequel elle coexiste dans le système naturel. Un polynucléotide est considéré comme isolé si, par exemple, il est cloné dans un vecteur qui ne fait pas partie de l'environnement naturel.

Anticorps et fragments de ceux-ci :

La présente invention fournit des agents de fixation, comme les anticorps qui fixent spécifiquement la protéine associée à la fixation du GHRH humain et étant associée à la

modulation de la prolifération cellulaire. Un tel agent est dit comme « fixant spécifiquement » à la protéine de modulation de la prolifération cellulaire s'il réagit à un niveau détectable (par exemple par un essai ELISA) avec une protéine associée à la modulation de la prolifération cellulaire ou une portion ou un variant de celle-ci et ne réagit pas de manière détectable avec d'autres protéines. « La fixation » se réfère à une association non covalente entre 2 molécules séparées de telle sorte qu'un complexe se forme. La capacité à la fixation peut être évaluée, par exemple, par la détermination de la constante de fixation pour la formation du complexe. La constante de fixation est la valeur obtenue lorsque la valeur de la concentration du complexe est divisée par le produit des valeurs des concentration des composants. En général, 2 produits sont dits « fixés » lorsque la constante de fixation atteint 10^3 l/mol. La constante de fixation peut être déterminée en utilisant des méthodes bien connues de l'homme du métier.

N'importe quel agent capable de répondre aux critères ci-dessus peut être considéré comme un agent fixant.

Dans la présente invention, un agent de fixation est de préférence un anticorps ou un fragment de celui-ci. Les anticorps peuvent être préparés par n'importe quelle technique disponible à l'homme du métier (cf. Harlow et Lane, *Antibodies. A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). En général, les anticorps peuvent être produits par des techniques de culture cellulaire incluant la génération d'anticorps monoclonaux ou *via* des transfections de gènes d'anticorps dans des cellules hôtes de bactéries ou de mammifères afin de produire des anticorps recombinants.

Parmi d'autres techniques, on préférera employer celles décrites ci-après. Un immunogène contenant le polypeptide est injecté chez un groupe de mammifères (par exemple souris, rats, lapins, moutons ou chèvres). Dans cette étape, les polypeptides de la présente invention peuvent servir d'immunogènes sans modification. Alternativement, et particulièrement pour des peptides de petite taille, une réponse immunitaire supérieure peut être induite si le polypeptide est joint à une protéine de transport comme l'albumine de sérum bovin ou l'hémocyanine de patelle. L'immunogène est injecté chez l'animal hôte, de préférence selon un schéma prédéterminé, et les animaux sont saignés périodiquement. Des anticorps polyclonaux spécifiques du polypeptide peuvent ainsi être purifiés à partir de tels antisérums, par exemple par chromatographie d'affinité en utilisant le peptide couplé à un support solide adéquat.

Protéines de fusion :

N'importe quel gène de fusion peut être réalisé par l'homme du métier pour analyser la localisation sub-cellulaire d'une protéine selon l'invention, en particulier la localisation sub-cellulaire de la protéine de séquence SEQ. ID. NO. 10. De nombreuses constructions plasmidiques sont disponibles commercialement comme la protéine
5 Glutathione S Transférase (GST) ou des protéines fluorescentes comme la Green Fluorescent Protein (GFP) ou encore et de manière non exhaustive un marquage poly-Histidine.

Des cellules hôtes eucaryotes humaines (par exemple HEK-293) sont sous-cultivées
10 durant 24 h avant le protocole de transfection permettant un métabolisme normal des cellules et une meilleure efficacité de transfection. Des concentrations croissantes (1, 5 et 10 µg) de vecteur seul contenant la protéine révélatrice (GFP, GST ou Tag Histidine) ou de vecteur contenant le polynucléotide de séquence SEQ. ID. NO. 8 ou le polynucléotide de séquence SEQ. ID. NO. 9 fusionnée avec la protéine révélatrice ont
15 été réalisées en utilisant le réactif Effectene® selon les recommandations du fabricant (Qiagen).

Les cellules sont ensuite analysées par microscopie confocale, par exemple, pour détecter la localisation de la protéine. Si la protéine est suspectée d'être sécrétée par exemple, les surnageants sont récupérés, lyophilisés, déposé sur gel d'acrylamide et
20 analysés par la technique de Western blot à l'aide d'anticorps dirigés contre la protéine révélatrice.

Compositions pharmaceutiques :

Selon certains aspects de l'invention, des produits tels que des polypeptides, anticorps et/ou acides nucléiques peuvent être incorporés dans des compositions pharmaceutiques
25 ou des vaccins. Les compositions pharmaceutiques comprennent un ou plusieurs de ces produits et un ou des excipients (transporteurs) pharmaceutiquement acceptables. Certaines compositions pharmaceutiques éventuellement utilisables comme vaccins pourront comprendre un ou plusieurs polypeptides et un activateur de la réponse immunitaire, comme un adjuvant ou un liposome (dans lequel le produit est incorporé).
30 Les compositions pharmaceutiques et les vaccins peuvent de plus contenir un système d'administration, comme des microsphères biodégradables (et par exemple les microsphères composées de copolymères d'acide lactique et d'acide glycolique ou PLGA). Les compositions pharmaceutiques et les vaccins dans l'étendue de la

divulgaration de la présente invention peuvent également contenir d'autres produits pouvant être biologiquement actifs ou inactifs.

- Une composition pharmaceutique ou un vaccin peut contenir de l'ADN codant pour un ou plusieurs polypeptides comme décrit ci-dessus, de telle sorte que le polypeptide est
5 généré *in situ*. Comme mentionné précédemment, l'ADN peut être présent sous n'importe quelle forme d'administration connue de l'homme du métier, y compris des systèmes d'expression d'acides nucléiques, bactériens ou viraux. Les systèmes d'expression d'acides nucléiques appropriés contiennent les séquences d'ADN nécessaires pour l'expression chez le patient.
- 10 Les systèmes d'administration basés sur une bactérie impliquent l'administration de *bacterium* (comme *Bacillus-Calmette-Guerrin*) qui exprime une portion immunogène du polypeptide à sa surface. De préférence, l'ADN peut être introduit en utilisant un système d'expression viral (par exemple un pox virus, un rétrovirus ou un adénovirus) impliquant l'utilisation d'agents non pathogènes (défectif).
- 15 Bien que tout transporteur adéquat connu de l'homme du métier puisse être employé dans des compositions pharmaceutiques de cette invention, le type de transporteur variera selon le mode d'administration choisi. Les compositions de la présente invention pourront être formulées pour chaque mode d'administration approprié, y compris, par exemple, les voies topique, nasale, intraveineuse, intra-craniale,
20 intra-péritonéale, sous-cutanée et intramusculaire.
- Pour une administration parentérale, comme une injection sous-cutanée, le transporteur contient de préférence de l'eau, du sel, de l'alcool, de la graisse, de la paraffine ou un tampon. Pour une administration orale, tout transporteur cité ci-dessus ou un transporteur solide, comme du mannitol, du lactose, de l'amidon, du stéarate de
25 magnésium, du talc, de la cellulose, du glucose, du sucrose et du carbonate de magnésium peut être employé. Des microsphères biodégradables peuvent aussi être utilisées comme transporteurs pour les compositions pharmaceutiques de cette invention. Pour certaines applications topiques, des formulations comme des crèmes ou des lotions sont préférées.
- 30 De telles compositions peuvent également comprendre des tampons (par exemple des solutions salines tamponnées neutres ou phosphate), des carbohydrates (par exemple du glucose, du mannose, du sucrose ou des dextrans), du mannitol, des protéines, des polypeptides ou des acides aminés comme la glycine, des antioxydants, des agents chélateurs comme l'EDTA ou la glutathione, des adjuvants (par exemple de
35 l'hydroxyde d'aluminium) et/ou des agents protecteurs. Alternativement, les

compositions de la présente invention peuvent se présenter sous forme d'un lyophilisat. Des produits peuvent également être encapsulés dans des liposomes en utilisant des technologies classiques.

5 Selon l'invention, chacune des variétés d'adjuvants peut être utilisée dans des vaccins pour induire la réponse immunitaire. La plupart des adjuvants contient une substance protégeant l'antigène d'un catabolisme rapide, comme l'hydroxyde d'aluminium ou l'huile minérale et un stimulateur des réponses immunitaires comme le lipide A, des protéines dérivées de Bordetella Pertussis ou Mycobacterium tuberculosis. Des adjuvants adéquats sont commercialement disponibles comme, par exemple : l'adjuvant 10 de Freund et l'adjuvant complet (Difco Laboratories, Detroit, MIY, Etats-Unis ; Merck Adjuvant 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ, Etats-Unis)), des microsphères biodégradables ; le lipide A monophosphoryle ; et des cytokines comme le GM-CSF ou l'interleukine-2, -7 ou -12.

15 Les compositions décrites ci-dessus peuvent également être administrées sous forme de formulations retard (i.e. une formulation comme une capsule ou une éponge qui déclenche la libération lente du produit après administration). De telles formulations peuvent généralement être préparées en utilisant des technologies bien connues de l'homme du métier et administrées, par exemple, par voie orale, rectale ou en 20 implantation sous-cutanée ou par implantation sur le site cible désiré. Les formulations retard peuvent contenir un polypeptide, un polynucléotide ou un anticorps dispersé dans une matrice transporteuse et/ou contenu dans un réservoir protégé par une membrane de diffusion. Les transporteurs pour l'utilisation de telles formulations sont biocompatibles et doivent également être biodégradables ; de préférence la formulation fournit un niveau relativement constant de la libération du composant actif. La quantité de produit 25 actif contenue dans la formulation retard dépend du site d'implantation.

Thérapie anticancéreuse :

Selon d'autres aspects de la présente invention, les produits décrits peuvent être utilisés en thérapie anticancéreuse. En particulier, les polynucléotides et polypeptides associés à la fixation du GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération 30 cellulaire peuvent être utilisés pour inhiber la croissance et induire une modulation de la prolifération cellulaire dans des tumeurs spécifiques du sein, de la prostate ou du cancer du poumon.

De tels polypeptides ou polynucléotides peuvent également être utilisés pour la thérapie de nombreux carcinomes incluant les mélanomes, les formes multiples de

glioblastomes, les carcinomes du poulmon ainsi que les cancers colorectaux. Des agents qui activent l'expression de tels polypeptides ou polynucléotides peuvent également être employés dans le cadre de ces thérapies.

5 Selon ces aspects de l'invention, les produits (pouvant être des polypeptides ou des acides nucléiques) sont de préférence incorporés dans des compositions pharmaceutiques comme décrit ci-dessus.

10 Les patients adéquats pour la thérapie sont tous les animaux à sang chaud, et de préférence l'être humain. Un patient éligible pour une thérapie selon l'invention peut ou non être diagnostiqué comme étant affecté par un cancer. Autrement dit, les compositions pharmaceutiques décrites ci-dessus peuvent ainsi être utilisées pour inhiber le développement d'un cancer à différents stades de la maladie (pour prévenir l'apparition d'un cancer ou pour traiter un patient affecté par un cancer).

Les compositions pharmaceutiques de la présente invention seront administrées de manière appropriée pour chaque cancer spécifique à traiter.

15 La voie, la durée et la fréquence d'administration seront déterminées en fonction de l'état du patient, du type et de la sévérité de la maladie, et de la méthode d'administration. Les voies et fréquences d'administration peuvent varier d'un individu à l'autre. En général, les compositions pharmaceutiques et les vaccins peuvent être administrés par injection (par exemple par la voie intra-cutanée, intramusculaire, 20 intraveineuse ou sous-cutanée), par voie intra-nasale (par exemple par inhalation) ou par voie orale. De préférence, entre 1 et 10 doses peuvent être administrées sur une période de 52 semaines. Des protocoles alternatifs peuvent être appropriés pour chaque patient individuellement.

25 En général, un dosage approprié et un régime de traitement contiennent le produit actif en quantité suffisante pour fournir un bénéfice thérapeutique et/ou prophylactique. Une telle réponse peut être suivie par l'établissement d'un devenir clinique amélioré (par exemple des rémissions plus fréquentes, une survie en absence de la maladie complète, partielle ou plus longue) chez les patients traités comparés aux patients non traités ou traités par des doses moindres.

30 Selon d'autres aspects de la présente invention, un polypeptide peut être administré à des doses variant de 100 µg à 5 mg. Les molécules d'ADN codant pour de tels polypeptides peuvent généralement être administrées en quantité suffisante pour générer des niveaux comparables de polypeptides. Des dosages appropriés peuvent généralement être déterminés en utilisant des modèles expérimentaux et/ou des essais

cliniques. En général, l'utilisation de la dose minimum suffisante pour fournir une thérapie efficace est préférée. Les patients peuvent généralement être suivis en ce qui concerne l'efficacité de la thérapie en utilisant des essais adéquats pour les conditions de traitement ou de prévention qui apparaîtront familiers à l'homme du métier.

- 5 A moins qu'ils ne soient définis d'une autre manière, tous les termes techniques et scientifiques utilisés ici ont la même signification que celle couramment comprise par un spécialiste ordinaire du domaine auquel appartient cette invention. De même, toutes les publications, demandes de brevets, tous les brevets et toutes autres références mentionnées ici sont incorporées par référence.
- 10 Les exemples suivants sont présentés pour illustrer les procédures ci-dessus et ne doivent en aucun cas être considérés comme une limite à la portée de l'invention.

EXEMPLES

Exemple 1 : clonage de l'ADNc codant pour l'hétérocarpine

1.1) Extraction des ARNs à partir des cellules de *Pilocarpus Heterophyllus* :

- 15 Les cellules en culture sont conservés à -80 °C avant les étapes d'extraction des ARNs totaux. L'extraction des ARNs totaux est basée sur une technique décrite dans la littérature scientifique (Chomczynski et Sacchi, *Anal. Biochem.* (1987), 162, 156) à l'aide du réactif Trizol (Gibco/BRL). La qualité des ARNs ainsi extraits est analysée sur gel d'agarose 1 % en présence de bromure d'éthidium.

20 1.2) Synthèse des ADNc par transcription inverse :

Les ARNs sont rétro-transcrits selon deux modes opératoires différents afin de dissocier et de favoriser les transcriptions inverses des parties 5' et 3' des ARNs à l'aide du kit SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech).

25 1.3) Design et synthèse des amorces pour la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) :

L'amplification des 2 séquences spécifiques de l'ADNc de l'hétérocarpine a été réalisée par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) sur les produits de la transcription inverse en utilisant l'amorce Rev1 pour les produits d'ADNc spécifiques 5' et l'amorce

cliniques. En général, l'utilisation de la dose minimum suffisante pour fournir une thérapie efficace est préférée. Les patients peuvent généralement être suivis en ce qui concerne l'efficacité de la thérapie en utilisant des essais adéquats pour les conditions de traitement ou de prévention qui apparaîtront familiers à l'homme du métier.

- 5 A moins qu'ils ne soient définis d'une autre manière, tous les termes techniques et scientifiques utilisés ici ont la même signification que celle couramment comprise par un spécialiste ordinaire du domaine auquel appartient cette invention.

Les exemples suivants sont présentés pour illustrer les procédures ci-dessus et ne doivent en aucun cas être considérés comme une limite à la portée de l'invention.

10 **EXEMPLES**

Exemple 1 : clonage de l'ADNc codant pour l'hétérocarpine

1.1) Extraction des ARNs à partir des cellules de *Pilocarpus Heterophyllus* :

Les cellules en culture sont conservés à -80 °C avant les étapes d'extraction des ARNs totaux. L'extraction des ARNs totaux est basée sur une technique décrite dans la
15 littérature scientifique (Chomczynski et Sacchi, *Anal. Biochem.* (1987), 162, 156) à l'aide du réactif Trizol (Gibco/BRL). La qualité des ARNs ainsi extraits est analysée sur gel d'agarose 1 % en présence de bromure d'éthidium.

1.2) Synthèse des ADNc par transcription inverse :

Les ARNs sont rétro-transcrits selon deux modes opératoires différents afin de dissocier
20 et de favoriser les transcriptions inverses des parties 5' et 3' des ARNs à l'aide du kit SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech).

1.3) Design et synthèse des amorces pour la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) :

L'amplification des 2 séquences spécifiques de l'ADNc de l'hétérocarpine a été réalisée
25 par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) sur les produits de la transcription inverse en utilisant l'amorce Rev1 pour les produits d'ADNc spécifiques 5' et l'amorce

Fwd1 pour les produits d'ADNc spécifiques 3' de séquences respectives SEQ. ID. NO. 4 et SEQ. ID. NO. 5.

Les séquences SEQ. ID. NO. 4 et SEQ. ID. NO. 5 sont les suivantes :

- SEQ. ID. NO. 4 :

5 5'-TCC AAG CAG CAA AAA CTA GTG ACC CAG GGG CCA TTA TAT CT-3'

- SEQ. ID. NO. 5 :

5'-CGG TAT GGA CGC GGC TAT TGC TGA TGG TGT TGA TGT AA-3'

1.4) Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et résultats :

Les conditions de réaction incluent 0,2 μ M de Fwd1 pour les produits d'ADNc spécifiques 3' et 0,2 μ M de Rev1 pour les produits d'ADNc spécifiques 5', 200 μ M dNTPs, 40 mM Tricine-KOH (pH 8,7), 15 mM KOAc, 3,5 mM Mg(OAc)₂, 3,75 μ g/ml BSA, 0,005% Tween-20, 0,005% Nonidet-P40, et 0,5 U Taq ADN polymérase dans un volume final de 50 μ l. Les réactions de PCR sont réalisées sur un thermocycleur Perkin-Elmer 9700 en utilisant les paramètres de cycles thermiques suivants : 5 cycles
10 comprenant une dénaturation à 94 °C pendant 5 s, une hybridation des amorces à 72 °C, 5 cycles comprenant une dénaturation à 94° C pendant 5 s, une hybridation des amorces à 70° C pendant 10 s, et une extension de polymérisation à 72° C pendant 3 minutes et
15 enfin 25 cycles comprenant une dénaturation à 94° C pendant 5 s, une hybridation des amorces à 68° C pendant 10 s, et une extension de polymérisation à 72° C pendant
20 3 minutes.

Les produits obtenus par la PCR sont séparés sur gel d'agarose 1 % et visualisés à l'aide d'une coloration au bromure d'éthidium.

Les séquences en acides nucléiques des produits de PCR d'ADNc spécifiques 5' et spécifiques 3' sont déterminées à l'aide d'un séquenceur automatique. Il s'agit
25 respectivement des séquences SEQ. ID. NO. 6 et SEQ. ID. NO. 7 reproduites ci-après :

- SEQ. ID. NO. 6 :

1 ctaatagcac tcactatagg gcaagcagtg gtatcaacgc agagtacgcg gggatgcccc
61 aagctaattc ttatcttttt tctttctttt tgttggtggt ttgtcaaagc agcaatgagg
121 tctaggaatg gtgttcttca tttattcctt ttcggtcttg catggcttct gttggcggct
30 181 ctccatgcta actcaagttc ggatgagaga tcaacatata tagttcatat ggacaagacc
241 catatgcccc aaaccttctc tagcccccac cattggtact ctteggtcgt tcgatccctc

301 aagtctacaa agccaaccaa attaaatcgc cgtcgatcct caccacttct tgtatactct
361 tacgacaatg ctgctcatgg tttcagtgca gttttatctc aacaggaact tgaaactcta
421 aaaaagtctc caggtttcgt ctcaagttat gccgataaga cagcgacact tgacaccacc
481 catacacctg aatttctctc cctgaatact gccaacgggt tgtggcctgc ttcaaagtat
5 541 ggtgaagata taattggttg tggtattgac agcgggtgtct ggccggagag tgaaagttat
601 aatgatgatg gtatgggagc tattccaagc agatggaagg gagaatgtga agctggacaa
661 gagttcaatt cctccatgtg caactcaaag cttattggag ctagatattt cgataagggt
721 atcattgagg caaatcctgg gattaacatt agcatgaaat ctgccagaga tactatgggg
781 catgggactc acacatcctc cacagttgct gggaattatg tggatggcgt ttcattcttt
10 841 ggctatgcta aaggtagcgc aaaaggagtg gcaccacggg cgagagtggc tatgtacaag
901 gtcatttttg acgaaggagg ctatgcatct gatgttcttg ccggtatgga cgcggctatt
961 gctgatgggtg ttgatgtaat ttcaatatca atgggatttg atgagacccc gttgtatgaa
1021 gatcctatag caattgcctc attcgtctgct acagagaagg gcgtagtggg ctcatcttca
1081 gcaggaaatg cagggccagc gctagggagc ttgcacaatg gaatcccatg gacgttaact
15 1141 gttgcagctg gaaccattga ccgttcattt gcaggcacta taactcttgg gagtggggaa
1201 accatcattg gatggacaat gttcccagcc agtgcttatg tagcagactt gccactgctt
1261 tataacaaga cttactctgc atgcaactca actcgattat tatctcaact ccgaactgac
1321 gccatcatcg tatgcaaga agctgaagat tcggtatctg agcaaataac tgttgctcagt
1381 gcatcgaaca ttcggggagc catatttggt tcagattatg atgctgaatt atttgaactt
20 1441 ggtggtgtga ctattcctgg tgcgtgatt agcaccaagg atgcaccggc tgtgatcagc
1501 tacgccagca atgatgtgaa acctaaggca agcatcaagt tccaacaaac tgttctgggc
1561 acaaagcctg caccagccgt ggctttctat acttctagag gtccgtcacc gagctatcca
1621 ggcactctaa agccagatat aatggcccct gggtcactag ttttgctgc ttgga

- SEQ. ID. NO. 7 :

25 1 cggtagtgac gcggctattg ctgatgggtg tgatgtaatt tcaatatcaa tgggatttga
61 tgagaccccg ttgatgaag atcctatagc aattgcctca ttcgctgcta cagagaaggg
121 cgtagtgggc tcatcttcag caggaaatgc agggccagcg ctagggagct tgcacaatgg
181 aatcccatgg acgttaactg ttgcagctgg aaccattgac cggttcatttg caggcactat

241 aactcttggg agtggggaaa ccatcattgg atggacaatg ttcccagcca gtgcttatgt
301 agcagacttg ccactgcttt ataacaagac ttactctgca tgcaactcaa ctcgattatt
361 atctcaactc cgaactgacg ccatcatcgt atgcgaagaa gctgaagatt cggatatctga
421 gcaaatatct gttgtcagtg catcgaacat tcggggagcc atatttgttt cagattatga
5 481 tgctgaatta tttgaacttg gtggtgtgac tattcctggg gtcgtgatta gcaccaagga
541 tgcaccggct gtgatcagct acgccagcaa tgatgtgaaa cctaaggcaa gcatcaagtt
601 ccaacaaact gttctgggca caaagcctgc accagccgtg gctttctata cttctagagg
661 tccgtcaccg agctatccag gcatcttaaa gccagatata atggcccctg ggtcactagt
721 ttttgctgct tggattccaa atactgctac agcccaaatt ggtttgaata ccctcttgac
10 781 aagtgaatac aatatggttt ctggaacatc aatggcctgc cctcatgctg ctggtgtagc
841 tgctctcctt aagggcgcac accctgaatg gagtgcagct gctattaggt ctgcaatgat
901 gactacagca aatcccttgg ataacacact aaatccaatc cgggacaatg gtctaataca
961 tttcacatct gcttcacctt tagctatggg agccggccaa gttgatccta atcgggcact
1021 tgatcctggg ttgatttatg aaaccacccc acaagattat gtgagcctcc tctgcactct
15 1081 gaacttcacc caaaaccaa tctgtccat tacaagatca aaccgttaca gctgctccac
1141 ccctaatact gatcttaact atccttcttt tattacttta cactacaaca caaatgcaac
1201 atttgttcag acttttcaca ggactgtgac taacgttgga ggaagcgcta caacttaca
1261 ggccaagatc actgctcctc taggttctgt agttagtgtc tcaccagaca cattggcctt
1321 cagaaagcag tatgagcagc agagctacga gctcactatt gagtacaagc ctgatggatga
20 1381 agaaactggt tcatttgggg aacttgtttg gattgaagaa aatgggaatc aactgtgag
1441 gagccctatt acagtgtcac cttccatgag taactttgtg tttatgggta cacaataatt
1501 gataaaaatt tgttctgatc acaactgtgg gaataatcga cgtttatgaa ccagaataa
1561 gttgtttggt cgtcttcaac attatcataa aggacttgaa tcatgtgtgt tgattttctg
1621 caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aagtactctg cgttgatacc actgcttgcc ctatagttag
25 1681 tcgtattag

Les séquences chevauchantes SEQ. ID. NO. 6 et SEQ. ID. NO. 7 permettent de déduire la séquence complète de l'ADNc de séquence SEQ. ID. NO. 8 codant pour l'hétérocarpine. La séquence SEQ. ID. NO. 8 est reproduite ci-après :

- SEQ. ID. NO. 8 :

```
5      1 ctaatacgac tcactatagg gcaagcagtg gtatcaacgc agagtacgcg gggatgcccc
      61 aagctaattc ttatcttttt tctttctttt tgttggtggt ttgtcaaagc agcaatgagg
     121 tctaggaatg gtgttcttca tttattcctt ttcgttcttg catggcttct gttggcggct
     181 ctccatgcta actcaagttc ggatgagaga tcaacatata tagttcatat ggacaagacc
     241 catatgccca aaaccttctc tagccccac cattgggtact cttcgggtcgt tcgatccctc
    10    301 aagtctacaa agccaaccaa attaaatcgc cgtcgatcct caccacttct tgtatactct
      361 tacgacaatg ctgctcatgg tttcagtgca gttttatctc aacaggaact tgaaactcta
     421 aaaaagtctc caggtttctg ctcagtttat gccgataaga cagcgacact tgacaccacc
     481 catacacctg aatttctctc cctgaatact gccaacgggt tgtggcctgc ttcaaagtat
     541 ggtgaagata taattgttgg tgttattgac agcgggtgtct ggccggagag tgaaagtatt
    15    601 aatgatgatg gtatgggcgc tattccaagc agatggaagg gagaatgtga agctggacaa
      661 gagttcaatt cctccatgtg caactcaaag cttattggag ctagatattt cgataagggg
     721 atcattgctg caaatcctgg gattaacatt agcatgaaat ctgccagaga tactatgggg
     781 catgggactc acacatcctc cacagttgct ggggaattat tggatggcgt ttcattcttt
     841 ggctatgcta aaggtagcgc aaaaggagtg gcaccacggg cgagagtggc tatgtacaag
    20    901 gtcatttttg acgaagggcg ctatgcatct gatgttcttg ccggtatgga cgcggtatt
      961 gctgatggtg ttgatgtaat ttcaatatca atgggatttg atgagacccc gttgtatgaa
     1021 gatcctatag caattgcctc attcgctgct acagagaagg gcgtagtggg ctcatcttca
     1081 gcaggaaatg cagggccagc gctagggagc ttgcacaatg gaatcccatg gacgttaact
     1141 gttgcagctg gaaccattga ccgttcattt gcaggcacta taactcttgg gagtggggaa
    25    1201 accatcattg gatggacaat gttcccagcc agtgcttatg tagcagactt gccactgctt
      1261 tataacaaga cttactctgc atgcaactca actcgattat tatctcaact ccgaactgac
     1321 gccatcatcg tatgcgaaga agctgaagat tcgggtatctg agcaaatac tgttgtcagt
     1381 gcatogaaca ttcggggagc catatttggt tcagattatg atgctgaatt atttgaactt
```

1441 ggtggtgtga ctattcctgg tgcgtgatt agcaccaagg atgcaccggc tgtgatcagc
1501 tacgccagca atgatgtgaa acctaaggca agcatcaagt tccaacaaac tgttctgggc
1561 acaaagcctg caccagccgt ggctttctat acttctagag gtccgtcacc gagctatcca
1621 ggcatcttaa agccagatat aatggcccct gggtcactag tttttgctgc ttggattcca
5 1681 aatactgcta cagcccaa at tggtttgaat accctcttga caagtgaata caatatgggt
1741 tctggaacat caatggcctg ccctcatgct gctgggtgtag ctgctctcct taagggcgca
1801 caccctgaat ggagtgcagc tgctattagg tctgcaatga tgactacagc aaatcccttg
1861 gataacacac taaatccaat ccgggacaat ggtctaatca atttcacatc tgcttcacct
1921 ttagctatgg gagccggcca agttgatcct aatcgggcac ttgatcctgg tttgatttat
10 1981 gaaaccaccc cacaagatta tgtgagcctc ctctgcactc tgaacttcac ccaaaaccaa
2041 atcctgtcca ttacaagatc aaaccgttac agctgctcca ccctaatacc tgatcttaac
2101 tatccttctt ttattacttt acactacaac acaaatgcaa catttggttca gacttttcac
2161 aggactgtga ctaacgttgg aggaagcgct acaacttaca aggccaagat cactgctcct
2221 ctaggttctg tagttagtgt ctaccagac acattggcct tcagaaagca gtatgagcag
15 2281 cagagctacg agctcactat tgagtacaag cctgatgggtg aagaaactgt ttcatttggg
2341 gaacttgttt ggattgaaga aaatgggaat cacactgtga ggagccctat tacagtgtca
2401 ccttccatga gtaactttgt gtttatgggt acacaataat tgataaaaaat ttgttctgat
2461 cacaactgtg ggaataatcg acgtttatga accagaata agttgtttgg tcgtcttcaa
2521 cattatcata aaggacttga atcatgtgtg ttgattttct gcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
20 2581 aaagtactct gcgttgatac cactgcttgc cctatagtga gtcgtattag

25 Dans la séquence SEQ. ID. NO. 8, l'on observe une phase ouverte de lecture avec la présence d'un codon initiateur (ATG) codant pour une méthionine initiatrice en position 115 et d'un codon stop (UAA) en position 2437. Le polynucléotide contenant la séquence codant pour l'hétérocarpine correspond à la séquence SEQ. ID. NO. 9, reproduite ci-après :

- SEQ. ID. NO. 9 :

1 atgaggtcta ggaatgggtg tcttcattta ttcttttctg ttcttgcatg gcttctggtg
61 gcggctctcc atgctaactc aagttcggat gagagatcaa catatatagt tcatatggac

121 aagacccata tgcccaaaac cttctctagc cccaccatt ggtactottc ggtcgttcga
181 tccctcaagt ctacaaagcc aaccaaatta aatcgccgtc gatcctcacc acttcttgta
241 tactcttacg acaatgctgc tcatggtttc agtgcagttt tatctcaaca ggaacttgaa
301 actctaaaaa agtctccagg tttcgtctca gtttatgccg ataagacagc gacacttgac
5 361 accacccata cacctgaatt tctctccctg aatactgcc aagggttggtg gcctgcttca
421 aagtatgggtg aagatataat tgttggtggt attgacagcg gtgtctggcc ggagagtga
481 agttataatg atgatggtat gggcgctatt ccaagcagat ggaagggaga atgtgaagct
541 ggacaagagt tcaattcctc catgtgcaac tcaaagctta ttggagctag atatttcgat
601 aagggtatca ttgcggcaaa tcctgggatt aacattagca tgaaatctgc cagagatact
10 661 atggggcatg ggactcacac atcctccaca gttgctggga attatgtgga tggcgtttca
721 ttctttggct atgctaaagg tacagcaaaa ggagtggcac cacgggagag agtggctatg
781 tacaagggtca tttttgacga agggcgctat gcatctgatg ttcttgccgg tatggacgcg
841 gctattgctg atggtgttga tgtaatttca atatcaatgg gatttgatga gaccccggtg
901 tatgaagatc ctatagcaat tgctcattc gctgctacag agaagggcgt agtggcttca
15 961 tcttcagcag gaaatgcagg gccagcgcta gggagcttgc acaatggaat cccatggacg
1021 ttaactgttg cagctggaac cattgaccgt tcatttgcag gcactataac tcttgggagt
1081 ggggaaacca tcattggatg gacaatgttc ccagccagtg cttatgtagc agacttgcca
1141 ctgctttata acaagactta ctctgcatgc aactcaactc gattattatc tcaactccga
1201 actgacgcc aatcgtatg cgaagaagct gaagattcgg tatctgagca aatatctgtt
20 1261 gtcagtgc atgaacattcg gggagccata tttgtttcag attatgatgc tgaattattt
1321 gaacttggtg gtgtgactat tcctggtgtc gtgattagca ccaaggatgc accggctgtg
1381 atcagctacg ccagcaatga tgtgaaacct aaggcaagca tcaagttcca acaaactgtt
1441 ctgggcacaa agcctgcacc agccgtggct ttctatactt ctagaggtcc gtcaccgagc

1501 tatccaggca tcttaaagcc agatataatg gccctgggt cactagtttt tgctgcttgg
 1561 attccaaata ctgctacagc ccaaattggg ttgaataccc tcttgacaag tgaatacaat
 1621 atgggtttctg gaacatcaat ggctgcct catgctgctg gtgtagctgc tctccttaag
 1681 ggcgcacacc ctgaatggag tgcagctgct attaggtctg caatgatgac tacagcaa
 5 1741 cccttggata acacactaaa tccaatccgg gacaatgggtc taatcaattt cacatctgct
 1801 tcaccttttag ctatgggagc cggccaagtt gatcctaatac gggcacttga tcttggtttg
 1861 atttatgaaa ccacccaca agattatgtg agcctcctct gcactctgaa cttcacccaa
 1921 aaccaaatacc tgtccattac aagatcaaac cgttacagct gctccacccc taatcctgat
 1981 cttaactatc cttcttttat tactttacac tacaacacaa atgcaacatt tgttcagact
 10 2041 tttcacagga ctgtgactaa cgttggagga agcgctacaa cttacaaggc caagatcact
 2101 gctcctctag gttctgtagt tagtgtctca ccagacacat tggccttcag aaagcagtat
 2161 gagcagcaga gctacgagct cactattgag tacaagcctg atgggtgaaga aactgtttca
 2221 tttggggaac ttgtttggat tgaagaaaat gggaatcaca ctgtgaggag ccctattaca
 2281 gtgtcacctt ccatgagtaa ctttgtgttt atgggtacac aataa

15 Au polynucléotide ainsi traduit correspond une protéine de séquence SEQ. ID. NO. 10,
 composée de 774 acides aminés et reproduite ci-après :

- SEQ. ID. NO. 10 :

1 M R S R N G V L H L F L F V L A W L L L A A L H A N S S S D
 31 E R S T Y I V H M D K T H M P K T F S S P H H W Y S S V V R
 20 61 S L K S T K P T K L N R R R S S P L L V Y S Y D N A A H G F
 91 S A V L S Q Q E L E T L K K S P G F V S V Y A D K T A T L D
 121 T T H T P E F L S L N T A N G L W P A S K Y G E D I I V G V
 151 I D S G V W P E S E S Y N D D G M G A I P S R W K G E C E A
 181 G Q E F N S S M C N S K L I G A R Y F D K G I I A A N P G I
 25 211 N I S M K S A R D T M G H G T H T S S T V A G N Y V D G V S

241 F F G Y A K G T A K G V A P R A R V A M Y K V I F D E G R Y
271 A S D V L A G M D A A I A D G V D V I S I S M G F D E T P L
301 Y E D P I A I A S F A A T E K G V V V S S S A G N A G P A L
331 G S L H N G I P W T L T V A A G T I D R S F A G T I T L G S
5 361 G E T I I G W T M F P A S A Y V A D L P L L Y N K T Y S A C
391 N S T R L L S Q L R T D A I I V C E E A E D S V S E Q I S V
421 V S A S N I R G A I F V S D Y D A E L F E L G G V T I P G V
451 V I S T K D A P A V I S Y A S N D V K P K A S I K F Q Q T V
481 L G T K P A P A V A F Y T S R G P S P S Y P G I L K P D I M
10 511 A P G S L V F A A W I P N T A T A Q I G L N T L L T S E Y N
541 M V S G T S M A C P H A A G V A A L L K G A H P E W S A A A
571 I R S A M M T T A N P L D N T L N P I R D N G L I N F T S A
601 S P L A M G A G Q V D P N R A L D P G L I Y E T T P Q D Y V
631 S L L C T L N F T Q N Q I L S I T R S N R Y S C S T P N P D
15 661 L N Y P S F I T L H Y N T N A T F V Q T F H R T V T N V G G
691 S A T T Y K A K I T A P L G S V V S V S P D T L A F R K Q Y
721 E Q Q S Y E L T I E Y K P D G E E T V S F G E L V W I E E N
751 G N H T V R S P I T V S P S M S N F V F M G T Q

20 **Exemple 2 : préparation de l'ADNc complet codant pour l'hétérocarpine pour une production d'hétérocarpine recombinante :**

2.1) Préparation des ARNs à partir de culture de cellules de *Pilocarpus Heterophyllus* :

Les cellules en culture sont conservés à -80°C avant les étapes d'extraction des ARNs totaux. L'extraction des ARNs totaux est basée sur une technique décrite dans la littérature scientifique (Chomczynski et Sacchi, *Anal. Biochem.* (1987), 162, 156) à
25 l'aide du réactif Trizol (Gibco/BRL). La qualité des ARNs ainsi extraits est analysée sur gel d'agarose 1 % en présence de bromure d'éthidium.

2.2) Transcription inverse à partir des ARN :

Les ARNs totaux sont transcrits de manière inverse avec des amorces Oligo(dT) en utilisant la transcriptase inverse Superscript® comme suggéré dans le manuel du fabricant (Gibco/BRL).

5 2.3) Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) sur les produits obtenus à partir de la transcription inverse :

L'amplification de l'ADNc de l'hétérocarpine a été réalisée par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) sur les produits de la transcription inverse en utilisant l'amorce Fwd2 et Rev2 de séquences respectives SEQ. ID. NO. 11 et SEQ. ID. NO. 12.

10 Les séquences SEQ. ID. NO. 11 et SEQ. ID. NO. 12 sont les suivantes :

- SEQ. ID. NO. 11 :

5'-GGG GGA TCC GAG GTC TAG GAA TGG TGT TCT TCA-3'

- SEQ. ID. NO. 12 :

5'-GGG CTC GAG TTG TGT ACC CAT AAA CAC AAA GTT ACT CAT GG-3'

15 L'amorce Fwd2 correspond aux nucléotides 118 à 140 de SEQ. ID. NO. 8 et inclut un site BamH1 (souligné) et trois nucléotides additionnels en partie 5' pour faciliter le clonage. L'amorce Rev2 correspond à la séquence complémentaire de la région contenant les nucléotides 2405 à 2436 de SEQ. ID. NO. 8 et inclut un site Xho1 (souligné) et trois nucléotides additionnels en partie 5' pour faciliter le clonage.

20 Les conditions de réaction incluent 50 ng des ADNc produits de la réaction de transcription inverse décrite ci-dessus, 0,2 µM de Fwd2 (SEQ. ID. NO. 11) et de Rev2 (SEQ. ID. NO. 12), 200 µM dNTPs, 40 mM Tricine-KOH (pH 8,7), 15 mM KOAc, 3,5 mM Mg(OAc)₂, 3,75 µg/ml BSA, 0,005% Tween-20, 0,005% Nonidet-P40, et 0,5 U Taq ADN polymérase dans un volume final de 50 µl. Les réactions de PCR sont
25 réalisées sur un thermocycleur Perkin-Elmer 9700 en utilisant les paramètres de cycles thermiques suivants : 5 cycles comprenant une dénaturation à 94 °C pendant 5 s, une hybridation des amorces à 72 °C, 5 cycles comprenant une dénaturation à 94° C pendant 5 s, une hybridation des amorces à 70° C pendant 10 s, et une extension de polymérisation à 72° C pendant 3 minutes et enfin 25 cycles comprenant une
30 dénaturation à 94° C pendant 5 s, une hybridation des amorces à 68° C pendant 10 s, et une extension de polymérisation à 72° C pendant 3 minutes.

Les produits obtenus par la PCR sont séparés sur gel d'agarose 1% et visualisés à l'aide d'une coloration au bromure d'éthidium. Une bande d'environ 2,3 kb est obtenue.

La séquence en acides nucléiques du produit de PCR est vérifiée à l'aide d'un séquenceur automatique et correspond à la séquence SEQ. ID. NO. 9 ayant subi
5 artificiellement une délétion du codon initiateur ATG afin de permettre l'expression de l'hétérocarpine recombinante à partir du vecteur pQE-TriSystem (Qiagen) en phase avec le site BamH1 ainsi qu'une délétion du codon stop pour conserver la traduction en phase de la protéine et ainsi permettre la synthèse d'une séquence 8xHis dans la région C-terminale de l'hétérocarpine. Cette séquence correspond à la séquence
10 SEQ. ID. NO. 13 reproduite ci-après :

- SEQ. ID. NO. 13 :

```
1  gggggatccg aggtctagga atggtgttct tcatttattc cttttcgttc ttgcatggct
61  tctgttggcg gctctccatg ctaactcaag ttcggatgag agatcaacat atatagttca
121 tatggacaag acccatatgc caaaaacctt ctctagcccc caccattggt actcttcggt
15 181 cgttcgatcc ctcaagtcta caaagccaac caaattaaat cgccgtcgat cctcaccact
241 tcttgtatac tcttacgaca atgctgctca tggtttcagt gcagttttat ctcaacagga
301 acttgaaact ctaaaaaagt ctccaggttt cgtctcagtt tatgccgata agacagcgac
361 acttgacacc acccatacac ctgaatttct ctccctgaat actgccaacg ggttgtggcc
421 tgcttcaaag tatggtgaag atataattgt tgggtgttatt gacagcgggtg tctggccgga
20 481 gagtgaaagt tataatgatg atggtatggg cgctattcca agcagatgga agggagaatg
541 tgaagctgga caagagttca attcctccat gtgcaactca aagcttattg gagctagata
601 ttctgataag ggtatcattg cggcaaatcc tgggattaac attagcatga aatctgccag
661 agatactatg gggcatggga ctcacacatc ctccacagtt gctgggaatt atgtggatgg
721 cgtttcatte tttggctatg ctaaaggtag agcaaaagga gtggcaccac gggcgagagt
25 781 ggctatgtac aaggtcattt ttgacgaagg gcgctatgca tctgatgttc ttgccggtat
841 ggacgcggct attgctgatg gtgttgatgt aatttcaata tcaatgggat ttgatgagac
901 cccgttgtat gaagatccta tagcaattgc ctcatcgcgt gctacagaga agggcgtagt
961 ggtctcatct tcagcaggaa atgcagggcc agcgctaggg agcttgcaca atggaatccc
1021 atggacgtta actgttgcag ctggaaccat tgaccgttca tttgcaggca ctataactct
30 1081 tgggagtggg gaaaccatca ttggatggac aatgttccca gccagtgctt atgtagcaga
```


1141 cttgccactg ctttataaca agacttactc tgcattgcaac tcaactcgat tattatctca
1201 actccgaact gacgccatca tcgtatgcga agaagctgaa gattcgggtat ctgagcaaatt
1261 atctgtttgtc agtgcattcga acattcgggg agccatattt gtttcagatt atgatgctga
1321 attatttgaa cttggtggtg tgactattcc tgggtgctg attagcacca aggatgcacc
5 1381 ggctgtgatc agctacgcca gcaatgatgt gaaacctaag gcaagcatca agttccaaca
1441 aactgttctg ggcacaaagc ctgcaccagc cgtggctttc tatacttcta gaggtccgtc
1501 accgagctat ccaggcatct taaagccaga tataatggcc cctggggtcac tagtttttgc
1561 tgcttggtgatt ccaataactg ctacagccca aattgggttg aataccctct tgacaagtga
1621 atacaatatg gtttctggaa catcaatggc ctgccctcat gctgctggtg tagctgctct
10 1681 ccttaagggc gcacaccctg aatggagtgc agctgctatt aggtctgcaa tgatgactac
1741 agcaaattccc ttggataaca cactaaatcc aatccgggac aatgggtctaa tcaatttcac
1801 atctgcttca cctttagcta tgggagccgg ccaagttgat cctaatacggg cacttgatcc
1861 tggtttgatt tatgaaacca cccaacaaga ttatgtgagc ctctctgca ctctgaactt
1921 caccctaaac caaatcctgt ccattacaag atcaaacgt tacagctgct ccaccctaa
15 1981 tcctgatctt aactatcctt cttttattac ttacactac aacacaaatg caacatttgt
2041 tcagactttt cacaggactg tgactaacgt tggaggaagc gctacaactt acaaggccaa
2101 gatcactgct cctctaggtt ctgtagttag tgtctcacca gacacattgg ccttcagaaa
2161 gcagtatgag cagcagagct acgagctcac tattgagtac aagcctgatg gtgaagaaac
2221 tgtttcattt ggggaacttg tttggattga agaaaatggg aatcacactg tgaggagccc
20 2281 tattacagtg tcaccttcca tgagtaactt tgtgtttatg ggtacacaac tcgagccc

Cette séquence code pour une protéine de séquence SEQ. ID. NO. 14 reproduite ci-après :

1 M A I S R E L V D P R S R N G V L H L F L F V L A W L L L A
31 A L H A N S S S D E R S T Y I V H M D K T H M P K T F S S P
25 61 H H W Y S S V V R S L K S T K P T K L N R R R S S P L L V Y
91 S Y D N A A H G F S A V L S Q Q E L E T L K K S P G F V S V
121 Y A D K T A T L D T H T P E F L S L N T A N G L W P A S K
151 Y G E D I I V G V I D S G V W P E S E S Y N D D G M G A I P
181 S R W K G E C E A G Q E F N S S M C N S K L I G A R Y F D K
30 211 G I I A A N P G I N I S M K S A R D T M G H G T H T S S T V
241 A G N Y V D G V S F F G Y A K G T A K G V A P R A R V A M Y

271 K V I F D E G R Y A S D V L A G M D A A I A D G V D V I S I
 301 S M G F D E T P L Y E D P I A I A S F A A T E K G V V V S S
 331 S A G N A G P A L G S L H N G I P W T L T V A A G T I D R S
 361 F A G T I T L G S G E T I I G W T M F P A S A Y V A D L P L
 5 391 L Y N K T Y S A C N S T R L L S Q L R T D A I I V C E E A E
 421 D S V S E Q I S V V S A S N I R G A I F V S D Y D A E L F E
 451 L G G V T I P G V V I S T K D A P A V I S Y A S N D V K P K
 481 A S I K F Q Q T V L G T K P A P A V A F Y T S R G P S P S Y
 511 P G I L K P D I M A P G S L V F A A W I P N T A T A Q I G L
 10 541 N T L L T S E Y N M V S G T S M A C P H A A G V A A L L K G
 571 A H P E W S A A A I R S A M M T T A N P L D N T L N P I R D
 601 N G L I N F T S A S P L A M G A G Q V D P N R A L D P G L I
 631 Y E T T P Q D Y V S L L C T L N F T Q N Q I L S I T R S N R
 661 Y S C S T P N P D L N Y P S F I T L H Y N T N A T F V Q T F
 15 691 H R T V T N V G G S A T T Y K A K I T A P L G S V V S V S P
 721 D T L A F R K Q Y E Q Q S Y E L T I E Y K P D G E E T V S F
 751 G E L V W I E E N G N H T V R S P I T V S P S M S N F V F M
 781 G T Q L E H H H H H H H H

Exemple 3 : production d'hétérocarpine recombinante par des bactéries :

20 La partie de l'ADNc codant pour l'hétérocarpine est insérée aux sites BamH1/Xho1 du vecteur d'expression pQE-TriSystem (Qiagen) et est exprimé en utilisant les bactéries *E. coli* M15 comme bactéries hôtes. 20 ml de milieu LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline et 25 µg/ml de kanamycine sont inoculés et les bactéries mises à 37 °C sous agitation pendant 12 h. A partir de cette culture, 1 litre de milieu LB contenant
 25 100 µg/ml d'ampicilline et 25 µg/ml de kanamycine est inoculé et les bactéries sont mises sous agitation à 37 °C jusqu'à l'obtention d'une densité optique à 600 nm de 0,6.

L'expression de l'hétérocarpine recombinante est réalisée par l'addition d'IPTG à la concentration finale de 1 mM pendant 4 à 5 h. Les bactéries sont ensuite récupérées par centrifugation à 4000xg pendant 20 min puis congelées dans l'azote liquide. Le culot
 30 est ensuite décongelé dans la glace pendant 15 min et suspendu dans un tampon de lyse pH 8,0 composé de 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl et 10 mM imidazole en présence de 1 mg/ml de lysozyme pendant 30 min dans la glace. La lyse est finalement complétée par une étape de sonication et les débris éliminés par centrifugation. Le lysat (4 ml) ainsi clarifié est mélangé avec 1 ml d'une suspension de matrice de nickel et mis
 35 en agitation à 4 °C pendant 60 min. L'ensemble du milieu réactionnel est placé dans une colonne, lavé en présence de 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl et 20 mM imidazole.

L'hétérocarpine est finalement éluée avec 4x 0,5 ml de tampon constitué de 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl et 250 mM imidazole.

Exemple 4 : production d'Hétérocarpine recombinante par des cellules d'insectes infectées par le baculovirus :

- 5 La partie de l'ADNc codant pour l'Hétérocarpine est insérée aux sites BamH1/Xho1 du vecteur d'expression pQE-TriSystem (Qiagen). Le vecteur pQE-TriSystem contient les séquences virales de *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPV) permettant la recombinaison homologue. Le baculovirus recombinant contenant la séquence de l'hétérocarpine est préparé par co-transfection du vecteur pQE-TriSystem
- 10 avec l'ADN linéarisé génomique du baculovirus dans des cellules d'insecte sf9 ou sf21 établies à partir de tissus ovarien de la larve *Spodoptera frugiperda*. Les cellules transfectées sont lavées avec du tampon phosphate et collectées par centrifugation à 1000xg pendant 5 min. Le culot est suspendu dans un tampon de lyse pH 8,0 composé de 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl et 10 mM imidazole. La lyse est finalement
- 15 complétée par une étape de sonication et les débris éliminés par centrifugation. Le lysat (4 ml) ainsi clarifié est mélangé avec 200 μl d'une suspension de matrice de nickel et mis en agitation à 4 °C pendant 60 min. L'ensemble du milieu réactionnel est placé dans une colonne, lavé en présence de 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl et 20 mM imidazole. L'hétérocarpine est finalement éluée avec 4x 0,5 ml de tampon constitué de
- 20 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl et 250 mM imidazole.

Exemple 5 : production d'Hétérocarpine recombinante par des cellules de mammifères :

- La partie de l'ADNc codant pour l'hétérocarpine est insérée aux sites BamH1/Xho1 du vecteur d'expression pQE-TriSystem (Qiagen). Le vecteur pQE-TriSystem contient les
- 25 séquences activatrices du cytomegalovirus (CMV) fusionnées au promoteur beta-actine de poulet permettant une expression hétérologue très importante. Des cellules humaines embryonnaires de rein (HEK-293) sont cultivées dans du milieu DMEM (milieu de Eagle modifié par Dulbeco) contenant 100 U/ml de pénicilline et 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de sulfate de streptomycine, complémentée avec du sérum de veau fœtal à 10%. Les cellules sont
- 30 sous-cultivées 24 h avant le protocole de transfection permettant un métabolisme normal des cellules et une meilleure efficacité de transfection. La transfection de 1 μg de pQE-TriSystem contenant l'ADNc codant pour l'hétérocarpine a été réalisée en utilisant le réactif Effectene® selon les recommandations du fabricant (Qiagen).

Les cellules transfectées sont lavées avec du tampon phosphate et collectées par centrifugation à 1000xg pendant 5 min. Le culot est suspendu dans un tampon de lyse pH 8,0 composé de 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM imidazole en présence de 0,05% Tween® 20. La lyse est finalement complétée par une étape de sonication et les
5 débris éliminés par centrifugation. Le lysat (4 ml) ainsi clarifié est mélangé avec 200 μl d'une suspension de matrice de nickel et mis en agitation à 4 °C pendant 60 min. L'ensemble du milieu réactionnel est placé dans une colonne, lavé en présence de 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl et 20 mM imidazole. L'hétérocarpine est finalement
10 éluee avec 4x 0,5 ml de tampon constitué de 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl et 250 mM imidazole.

Exemple 6 : mesure de la liaison au récepteur humain à GHRH :

Transfections stables du récepteur humain à GHRH (hGHRH-R) :

Les cellules humaines embryonnaires de reins, HEK-293, (une lignée cellulaire développée par le Dr. Stuart Sealfon, Mount Sinai Medical School, New York, New
15 York) exprimant de manière stable le récepteur humain à GHRH ont été obtenues du Dr. Kelly Mayo (Northwestern University, Chicago, IL).

Culture cellulaire et préparation membranaire :

Les cellules HEK-293 transfectées de manière stable avec le récepteur humain à GHRH décrites ci-dessus sont cultivées en DMEM (milieu de Eagle modifié par Dulbecco,
20 forte teneur en glucose ; fourni par Life technologies) supplémenté avec 0,4 mg/ml de G418 (Life technologies) en présence de 10 % de sérum de veau fœtal et de 4 mM de L-glutamine (Life technologies). Les cellules sont homogénéisées dans le tampon A contenant 50 mM HEPES (pH 7,4), 5 mM de chlorure de magnésium (MgCl_2), 2 mM d'acide éthylèneglycol-bis(2-amino-éthyl)-N,N,N',N'-tétraacétique (EGTA) et
25 50 $\mu\text{g/ml}$ de bacitracine puis sont soumises à sonication dans le même tampon A. Les cellules ainsi homogénéisées sont centrifugées à 4° C à 39 000 g pendant 10 minutes, suspendues dans le tampon A et re-centrifugées à 4° C à 40 000 g pendant 10 minutes. Les protéines totales membranaires sont quantifiées par la technique de Bradford. Les membranes culottées sont ainsi stockées à -80° C pour une utilisation ultérieure.

Test de liaison compétitive sur hGHRH-R :

Les membranes des cellules HEK-293 transfectées de manière stable avec le récepteur humain à GHRH sont diluées à la concentration de 100 $\mu\text{g/ml}$ dans le tampon réactionnel contenant 50 mM HEPES (pH 7,4), 5 mM de MgCl_2 , 2 mM d'EGTA,

50 µg/ml de bacitracine et 0,5 % d'albumine de sérum bovin (BSA). Les membranes sont incubées avec 0,05 nM de [¹²⁵I]GHRH(1-44 amide) (Amersham) dans un volume final de 200 µl en présence de concentrations croissantes d'hétérocarpine pendant 2 heures à 23° C. La réaction est arrêtée par une filtration rapide sur des filtres 96 puits GF/C pré-chargés à 0,1 % en polyéthylènimine. Les filtres sont ensuite lavés trois fois à 4° C avec du tampon de lavage contenant 50 mM Tris (pH 7,4) en utilisant une station de filtration Packard 96 puits. Les filtres ainsi séchés sont submergés de 20 µl de cocktail scintillant (Microscint O, Packard) et sont soumis à un comptage sur le Topcount (Packard). L'activité non-spécifique est déterminée en présence de 100 nM de hGHRH. Une courbe dose-réponse est générée pour hGHRH (0,001 nM-100 nM) et permet de déterminer la concentration inhibitrice CI₅₀ de protéine / de polypeptide à laquelle 50% du GHRH humain n'est pas fixé sur le récepteur humain à GHRH.

Revendications

1. Polynucléotide isolé comprenant la séquence SEQ. ID. NO. 8 ou un de ses fragments.
2. Polynucléotide isolé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un polynucléotide de séquence SEQ. ID. NO. 8.
- 5 3. Polynucléotide isolé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un polynucléotide de séquence SEQ. ID. NO. 9.
4. Polynucléotide de séquence SEQ. ID. NO. 4, SEQ. ID. NO. 5, SEQ. ID. NO. 11 ou SEQ. ID. NO. 12.
5. Polynucléotide de séquence SEQ. ID. NO. 13.
- 10 6. Polypeptide isolé comprenant la séquence SEQ. ID. NO. 14 ou un de ses fragments.
7. Polypeptide isolé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un polypeptide de séquence SEQ. ID. NO. 14.
8. Vecteur d'expression contenant un polynucléotide de séquence SEQ. ID. NO. 13.
9. Cellule hôte transformée ou transfectée par un vecteur d'expression selon la
15 revendication 8.
10. Procédé de préparation d'un polypeptide isolé comprenant la protéine codée par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou SEQ. ID. NO. 13 ou un des fragments de cette dernière ou bien par une séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un des fragments de cette dernière, ledit
20 polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire, ladite méthode de préparation comprenant les étapes successives suivantes :
 - (a) culture, dans des conditions convenables pour obtenir l'expression dudit polypeptide
25 d'une cellule hôte transformée ou transfectée avec un vecteur d'expression comprenant un polynucléotide isolé comprenant la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou SEQ. ID. NO. 13, la séquence complémentaire à la séquence polynucléotidique

SEQ. ID. NO. 9 ou SEQ. ID. NO. 13 ou encore un des fragments de ces dernières, ledit polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire, et

5 (b) isolement du polypeptide à partir des cultures de cellules hôtes.

11. Anticorps ou fragment de liaison de l'antigène de celui-ci, qui fixe spécifiquement la protéine de séquence SEQ. ID. NO. 10 ou la protéine de séquence SEQ. ID. NO. 14.

12. En tant que médicament, un polynucléotide selon l'une des revendications 1 à 3.

13. En tant que médicament, un polypeptide selon la revendication 6 ou 7.

10 14. Composition pharmaceutique comprenant, à titre de principe actif, un polynucléotide selon l'une des revendications 1 à 3.

15. Composition pharmaceutique comprenant, à titre de principe actif, un polypeptide selon la revendication 6 ou 7.

15 16. Utilisation d'un polynucléotide selon l'une des revendications 1 à 3 pour préparer un médicament destiné à traiter une maladie proliférative.

17. Utilisation d'un polypeptide selon la revendication 6 ou 7 pour préparer un médicament destiné à traiter une maladie proliférative.

20 18. Méthode pour l'identification de composés susceptibles de fixer le GHRH humain et de moduler la prolifération cellulaire, laquelle comprend les étapes successives suivantes :

(a) mise en contact de chaque composé candidat, dans des conditions et pendant un temps suffisant pour permettre à l'agent candidat de se fixer au polypeptide, avec un polypeptide isolé comprenant :

25 - soit un fragment de la protéine codée par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou par une séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9,

- soit un fragment de la protéine codée par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 13 ou par une séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 13,

ledit polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire, et

- 5 (b) détection de la fixation de chaque composé candidat audit polypeptide et identification, parmi les composés candidats, des composés susceptibles de fixer le GHRH humain et de moduler la prolifération cellulaire.

SEQUENCE LISTING

<110> Société de Conseils de Recherches et d'Applications Scientifiques (S.C.R.A.S.)

<120> Procédé de préparation d'hétérocarpine recombinante

<130> RS 331 FR

<160> 14

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Pilocarpus Heterophyllus (fragment peptidique)

<400> 1

Lys	Leu	Ile	Gly	Ala	Arg	Tyr	Phe	Asp	Lys
1				5				10	

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> Pilocarpus Heterophyllus (fragment peptidique)

<400> 2

Tyr	Gly	Glu	Asp	Ile	Ile	Val	Gly	Val	Ile	Asp	Ser	Gly	Val
1				5					10				

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> Pilocarpus Heterophyllus (fragment peptidique)

<400> 3

Pro	Glu	Ser	Glu	Ser	Tyr
1			5		

<210> 4
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amorce pour produits d'ADNc spécifiques 5'

<400> 4
 tccaagcagc aaaaactagt gaccagggg ccattatatt t
 41

<210> 5
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amorce pour produits d'ADNc spécifiques 3'

<400> 5
 cggatatggac gcggctattg ctgatgggtg tgatgtaa
 38

<210> 6
 <211> 1675
 <212> DNA
 <213> Pilocarpus Heterophyllus (fragment d'ADNc 5' de l'ADNc codant pour l'hétérocarpine)

<400> 6
 ctaatacgac tcactatagg gcaagcagtg gtatcaacgc agagtacgcg gggatgcc
 cc 60

aagctaattc ttatcttttt tctttctttt tgttggtggt ttgtcaaagc agcaatga
 gg 120

tctaggaatg gtgttcttca ttatttcctt ttcgttcttg catggcttct gttggcgg
 ct 180

ctccatgcta actcaagttc ggatgagaga tcaacatata tagttcatat ggacaaga
 cc 240

catatgcca aaaccttctc tagcccccac cattgggtact cttcggtcgt tcgatccc

tc 300

aagtctacaa agccaaccaa attaaatcgc cgtcgcctc caccacttct tgtatact
ct 360

tacgacaatg ctgctcatgg ttccagtgc gttttatctc aacaggaact tgaaactc
ta 420

aaaaagtctc caggtttcgt ctccagtttat gccgataaga cagcgacact tgacacca
cc 480

catacacctg aatttctctc cctgaatact gccaacgggt tggggcctgc ttcaaagt
at 540

ggtgaagata taattggtgg tggatttgac agcgggtgtct ggccggagag tgaaagtt
at 600

aatgatgatg gtatgggcgc tattccaagc agatggaagg gagaatgtga agctggac
aa 660

gagttcaatt cctccatgtg caactcaaag cttattggag ctagatatct cgataagg
gt 720

atcattgcgg caaatcctgg gattaacatt agcatgaaat ctgccagaga tactatgg
gg 780

catgggactc acacatcctc cacagttgct gggaattatg tggatggcgt ttcattct
tt 840

ggctatgcta aaggtacagc aaaaggagtg gcaccacggg cgagagtggc tatgtaca
ag 900

gtcatttttg acgaaggggc ctatgcctct gatgttcttg ccggtatgga cgcggcta
tt 960

gctgatgggtg ttgatgtaat ttcaatatca atgggatttg atgagacccc gttgtatg
aa 1020

gacctatag caattgcctc attcgtctgt acagagaagg gcgtagtggt ctcatctt
ca 1080

gcaggaaatg cagggccagc gctagggagc ttgcacaatg gaatcccatg gacgttaa
ct 1140

gttgacgctg gaaccattga ccgttcattt gcaggcacta taactcttgg gaggggg
aa 1200

accatcattg gatggacaat gttcccagcc agtgcttatg tagcagactt gccactgc
tt 1260

tataacaaga cttactctgc atgcaactca actcgattat tatctcaact ccgaactg
ac 1320

gccatcatcg tatgcgaaga agctgaagat tcggtatctg agcaaatatc tgttgtca
gt 1380

gcacgaaca ttcggggagc catatttggt tcagattatg atgctgaatt atttgaac
tt 1440

ggtggtgtga ctattcctgg tgtcgtgatt agcaccaagg atgcaccggc tgtgatca
gc 1500

tacgccagca atgatgtgaa acctaaggca agcatcaagt tccaacaaac tgttctgg
gc 1560

acaaagcctg caccagccgt ggctttctat acttctagag gtccgtcacc gagctatc
ca 1620

ggcatcttaa agccagatat aatggcccct gggtcactag tttttgctgc ttgga
1675

<210> 7

<211> 1689

<212> DNA

<213> Pilocarpus Heterophyllus (fragment d'ADNc 3' de l'ADNc c
odant pour l'hétérocarpine)

<400> 7

cggatggac gcggctattg ctgatggtgt tgatgtaatt tcaatatcaa tgggattt
ga 60

tgagaccccg ttgtatgaag atcctatagc aattgcctca ttcgctgcta cagagaag
gg 120

cgtagtggtc tcattctcag caggaaatgc agggccagcg ctaggagct tgcacaat
gg 180

aatcccatgg acgttaactg ttgcagctgg aaccattgac cgttcatttg caggcact
at 240

aactcttggg agtggggaaa ccatcattgg atggacaatg ttcccagcca gtgcttat

gt 300

agcagacttg ccactgcttt ataacaagac ttactctgca tgcaactcaa ctcgatta
tt 360

atctcaactc cgaactgacg ccatcatcgt atgcgaagaa gctgaagatt cggatatct
ga 420

gcaaatatct gttgtcagtg catcgaacat tcggggagcc atatttgttt cagattat
ga 480

tgctgaatta tttgaacttg gtggtgtgac tattcctggt gtcgtgatta gcaccaag
ga 540

tgcaccggct gtgatcagct acgccagcaa tgatgtgaaa cctaaggcaa gcatcaag
tt 600

ccaacaaact gttctgggca caaagcctgc accagccgtg gctttctata cttctaga
gg 660

tccgtcaccg agctatccag gcatcttaaa gccagatata atggcccctg ggtcacta
gt 720

ttttgctgct tggattccaa atactgctac agcccaaatt ggtttgaata ccctcttg
ac 780

aagtgaatac aatatgggtt ctggaacatc aatggcctgc cctcatgctg ctggtgta
gc 840

tgctctcctt aagggcgcac accctgaatg gagtgcagct gctattaggt ctgcaatg
at 900

gactacagca aatcccttgg ataacacact aaatccaatc cgggacaatg gtctaata
aa 960

tttcacatct gcttcacctt tagctatggg agccggccaa gttgatccta atcgggca
ct 1020

tgatcctggt ttgatttatg aaaccacccc acaagattat gtgagcctcc tctgcaat
ct 1080

gaacttcacc caaaacaaaa tcctgtccat tacaagatca aaccgttaca gctgctcc
ac 1140

ccctaatact gatcttaact atccttcttt tattacttta cactacaaca caaatgca
ac 1200

atttgttcag actttttcaca ggactgtgac taacgttgga ggaagcgcta caacttac
aa 1260

ggccaagatc actgctcctc taggtttctgt agttagtgtc tcaccagaca cattggcc
tt 1320

cagaaagcag tatgagcagc agagctacga gctcactatt gagtacaagc ctgatggg
ga 1380

agaaactgtt tcatttgggg aacttgtttg gattgaagaa aatgggaatc aactgtg
ag 1440

gagccctatt acagtgtcac cttccatgag taactttgtg tttatgggta cacaataa
tt 1500

gataaaaatt tgttctgac acaactgtgg gaataatcga cgtttatgaa cccagaat
aa 1560

gttgtttggg cgtcttcaac attatcataa aggacttgaa tcatgtgtgt tgattttc
tg 1620

caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aagtactctg cgttgatacc actgcttgcc ctatagtg
ag 1680

tcgtattag
1689

<210> 8
<211> 2630
<212> DNA
<213> Pilocarpus Heterophyllus (ADNc codant pour l'hétérocarpi
ne)

<400> 8
ctaatacgac tcactatagg gcaagcagtg gatatcaacgc agagtacgcg gggatgcc
cc 60

aagctaattc ttatcttttt tctttctttt tgttggtgtt ttgtcaaagc agcaatga
gg 120

tctaggaatg gtgttcttca tttattcctt ttcgttcttg catggcttct gttggcgg
ct 180

ctccatgcta actcaagttc ggatgagaga tcaacatata tagttcatat ggacaaga

cc 240

catatgcccc aaaccttctc tagcccccac cattggtact cttcggtcgt tcgatccc
tc 300

aagtctacaa agccaaccaa attaaatcgc cgtcgatcct caccacttct tgtatact
ct 360

tacgacaatg ctgctcatgg tttcagtgca gttttatctc aacaggaact tgaaactc
ta 420

aaaaagtctc cagggtttcgt ctcagtttat gccgataaga cagcgacact tgacacca
cc 480

catacacctg aatttctctc cctgaatact gccaacgggt tgtggcctgc ttcaaagt
at 540

ggtgaagata taattgttgg tgttattgac agcgggtgtct ggccggagag tgaaagtt
at 600

aatgatgatg gtatgggcgc tattccaagc agatggaagg gagaatgtga agctggac
aa 660

gagttcaatt cctccatgtg caactcaaag cttattggag ctagatatatt cgataagg
gt 720

atcattgcgg caaatcctgg gattaacatt agcatgaaat ctgccagaga tactatgg
gg 780

catgggactc acacatcctc cacagttgct gggaattatg tggatggcgt ttcattct
tt 840

ggctatgcta aaggtacagc aaaaggagtg gcaccacggg cgagagtggc tatgtaca
ag 900

gtcatttttg acgaagggcg ctatgcatct gatgttcttg ccggtatgga cgcggcta
tt 960

gctgatgggtg ttgatgtaat ttcaatatca atgggatttg atgagacccc gttgtatg
aa 1020

gacacctatg caattgcctc attcgtctgt acagagaagg gcgtagtggt ctcatctt
ca 1080

gcaggaaatg cagggccagc gctagggagc ttgcacaatg gaatcccatg gacgttaa
ct 1140

gttgcagctg gaaccattga ccgttcattt gcaggcacta taactcttgg gagtgggg
aa 1200

accatcattg gatggacaat gttcccagcc agtgcttatg tagcagactt gccactgc
tt 1260

tataacaaga cttactctgc atgcaactca actcgattat tatctcaact ccgaactg
ac 1320

gccatcatcg tatgcgaaga agctgaagat tcggtatctg agcaaatatc tgttgtca
gt 1380

gcacgaaca ttcggggagc catatttggt tcagattatg atgctgaatt atttgaac
tt 1440

ggtggtgtga ctattcctgg tgtcgtgatt agcaccaagg atgcaccggc tgtgatca
gc 1500

tagccagca atgatgtgaa acctaaggca agcatcaagt tccaacaaac tgttctgg
gc 1560

acaaagcctg caccagccgt ggctttctat acttctagag gtccgtcacc gagctatc
ca 1620

ggcatcttaa agccagatat aatggcccct gggtcactag tttttgctgc ttggattc
ca 1680

aatactgcta cagcccaaatt tggtttgaat accctcttga caagtgaata caatatgg
tt 1740

tctggaacat caatggcctg cctcatgct gctggtgtag ctgctctcct taagggcg
ca 1800

cacctgaat ggagtgcagc tgctattagg tctgcaatga tgactacagc aaatccct
tg 1860

gataacacac taaatccaat ccgggacaat ggtctaataca atttcacatc tgcttcac
ct 1920

ttagctatgg gagccggcca agttgatcct aatcgggcac ttgatcctgg tttgattt
at 1980

gaaaccaccc cacaagatta tgtgagcctc ctctgcactc tgaacttcac ccaaaacc
aa 2040

atcctgtcca ttacaagatc aaaccgttac agctgctcca cccctaatacc tgatctta
ac 2100

tatccttctt ttattacttt acactacaac acaaagtcaa catttggtca gacttttc
ac 2160

aggactgtga ctaacgttgg aggaagcgt acaacttaca aggccaagat cactgctc
ct 2220

ctaggttctg tagttagtgt ctcaccagac acattggcct tcagaaagca gtatgagc
ag 2280

cagagctacg agctcactat tgagtacaag cctgatggtg aagaaactgt ttcatttg
gg 2340

gaacttggtt ggattgaaga aaatgggaat cacactgtga ggagccctat tacagtgt
ca 2400

ccttccatga gtaactttgt gtttatgggt acacaataat tgataaaaat ttgttctg
at 2460

cacaactgtg ggaataatcg acgtttatga acccagaata agttgttttg tcgtcttc
aa 2520

cattatcata aaggacttga atcatgtgtg ttgattttct gcaaaaaaaaa aaaaaaaaa
aa 2580

aaagtactct gcgttgatac cactgcttgc cctatagtga gtcgtattag
2630

<210> 9
<211> 2325
<212> DNA
<213> Pilocarpus Heterophyllus (partie codante de l'ADNc codan
t pour l'hétérocarpine)

<400> 9
atgaggtcta ggaatggtgt tcttcattta ttccttttcg ttcttgcatt gcttctgt
tg 60

gcggtctccc atgctaactc aagttcggat gagagatcaa catatatagt tcatatgg
ac 120

aagaccata tgcccaaac cttctctagc cccaccatt ggtactcttc ggtcgttc
ga 180

tccctcaagt ctacaaagcc aaccaaatta aatcgccgtc gatcctcacc acttcttg
ta 240

tactcttacg acaatgctgc tcatggtttc agtgcagttt tatctcaaca ggaacttg
aa 300

actctaaaaa agtctccagg tttcgtctca gtttatgccg ataagacagc gacacttg
ac 360

accacccata cacctgaatt tctctccctg aatactgcc aacgggttggtg gcctgctt
ca 420

aagtatggtg aagatataat tggttggtgtt attgacagcg gtgtctggcc ggagagtg
aa 480

agttataatg atgatggtat gggcgctatt ccaagcagat ggaagggaga atgtgaag
ct 540

ggacaagagt tcaattcctc catgtgcaac tcaaagctta ttggagctag atatttcg
at 600

aagggtatca ttgcggcaaa tcctgggatt aacattagca tgaaatctgc cagagata
ct 660

atggggcatg ggactcacac atcctccaca gttgctggga attatgtgga tggcgttt
ca 720

ttctttggct atgctaaagg tacagcaaaa ggagtggcac cacggggcag agtggcta
tg 780

tacaaggta tttttgacga agggcgctat gcactctgatg ttcttgccgg tatggacg
cg 840

gctattgctg atgggtgttg tgtaatttca atatcaatgg gatttgatga gaccccg
tg 900

tatgaagatc ctatagcaat tgcctcatc gctgctacag agaagggcgt agtggctc
ca 960

tcttcagcag gaaatgcagg gccagcgcta gggagcttgc acaatggaat cccatgga
cg 1020

ttaactgttg cagctggaac cattgaccgt tcatttgcag gcactataac tcttgga
gt 1080



ggggaaacca tcattggatg gacaatgttc ccagccagtg cttatgtagc agacttgc
ca 1140

ctgctttata acaagactta ctctgcatgc aactcaactc gattattatc tcaactcc
ga 1200

actgacgcca tcatcgtatg cgaagaagct gaagattcgg tatctgagca aatatctg
tt 1260

gtcagtgcac cgaacattcg gggagccata tttgtttcag attatgatgc tgaattat
tt 1320

gaacttgggtg gtgtgactat tcctgggtgc gtgattagca ccaaggatgc accggctg
tg 1380

atcagctacg ccagcaatga tgtgaaacct aaggcaagca tcaagttcca acaaactg
tt 1440

ctgggcacaa agcctgcacc agccgtggct ttctatactt ctagaggctc gtcaccga
gc 1500

tatccaggca tcttaaagcc agatataatg gcccctgggt cactagtttt tgctgctt
gg 1560

attccaaata ctgctacagc ccaaattgggt ttgaataccc tcttgacaag tgaataca
at 1620

atggtttctg gaacatcaat ggctgcct catgctgctg gtgtagctgc tctcctta
ag 1680

ggcgcacacc ctgaatggag tgcagctgct attaggtctg caatgatgac tacagcaa
at 1740

cccttggata acacactaaa tccaatccgg gacaatggtc taatcaattt cacatctg
ct 1800

tcacctttag ctatgggagc cggccaagtt gatcctaata gggcacttga tcctgggt
tg 1860

atztatgaaa ccacccacac agattatgtg agcctcctct gcactctgaa cttcaccc
aa 1920

aaccaaattc tgtccattac aagatcaaac cgttacagct gctccacccc taatcctg
at 1980

cttaactatc cttcttttat tactttacac tacaacacaa atgcaacatt tgttcaga

ct 2040

tttcacagga ctgtgactaa cgttggagga agcgctacaa cttacaaggc caagatca
ct 2100

gctcctctag gttctgtagt tagtgtctca ccagacacat tggccttcag aaagcagt
at 2160

gagcagcaga gctacgagct cactattgag tacaagcctg atggtgaaga aactgttt
ca 2220

tttggggaac ttgtttggat tgaagaaaat gggaatcaca ctgtgaggag ccctatta
ca 2280

gtgtcacctt ccatgagtaa ctttgtgttt atgggtacac aataa
2325

<210> 10

<211> 774

<212> PRT

<213> Pilocarpus Heterophyllus (hétérocarpine)

<400> 10

Met Arg Ser Arg Asn Gly Val Leu His Leu Phe Leu Phe Val Leu Ala

1 5 10 15

Trp Leu Leu Leu Ala Ala Leu His Ala Asn Ser Ser Ser Asp Glu Arg

20 25 30

Ser Thr Tyr Ile Val His Met Asp Lys Thr His Met Pro Lys Thr Phe

35 40 45

Ser Ser Pro His His Trp Tyr Ser Ser Val Val Arg Ser Leu Lys Ser

50 55 60

Thr Lys Pro Thr Lys Leu Asn Arg Arg Arg Ser Ser Pro Leu Leu Val

65

70

75

80

Tyr Ser Tyr Asp Asn Ala Ala His Gly Phe Ser Ala Val Leu Ser Gln

85

90

95

Gln Glu Leu Glu Thr Leu Lys Lys Ser Pro Gly Phe Val Ser Val Tyr

100

105

110

Ala Asp Lys Thr Ala Thr Leu Asp Thr Thr His Thr Pro Glu Phe Leu

115

120

125

Ser Leu Asn Thr Ala Asn Gly Leu Trp Pro Ala Ser Lys Tyr Gly Glu

130

135

140

Asp Ile Ile Val Gly Val Ile Asp Ser Gly Val Trp Pro Glu Ser Glu

145

150

155

160

Ser Tyr Asn Asp Asp Gly Met Gly Ala Ile Pro Ser Arg Trp Lys Gly

165

170

175

Glu Cys Glu Ala Gly Gln Glu Phe Asn Ser Ser Met Cys Asn Ser Lys

180	185	190
Leu Ile Gly Ala Arg Tyr Phe Asp Lys Gly Ile Ile Ala Ala Asn Pro		
195	200	205
Gly Ile Asn Ile Ser Met Lys Ser Ala Arg Asp Thr Met Gly His Gly		
210	215	220
Thr His Thr Ser Ser Thr Val Ala Gly Asn Tyr Val Asp Gly Val Ser		
225	230	235
		240
Phe Phe Gly Tyr Ala Lys Gly Thr Ala Lys Gly Val Ala Pro Arg Ala		
245	250	255
Arg Val Ala Met Tyr Lys Val Ile Phe Asp Glu Gly Arg Tyr Ala Ser		
260	265	270
Asp Val Leu Ala Gly Met Asp Ala Ala Ile Ala Asp Gly Val Asp Val		
275	280	285
Ile Ser Ile Ser Met Gly Phe Asp Glu Thr Pro Leu Tyr Glu Asp Pro		
290	295	300

Ile Ala Ile Ala Ser Phe Ala Ala Thr Glu Lys Gly Val Val Val Ser
305 310 315 320

Ser Ser Ala Gly Asn Ala Gly Pro Ala Leu Gly Ser Leu His Asn Gly
325 330 335

Ile Pro Trp Thr Leu Thr Val Ala Ala Gly Thr Ile Asp Arg Ser Phe
340 345 350

Ala Gly Thr Ile Thr Leu Gly Ser Gly Glu Thr Ile Ile Gly Trp Thr
355 360 365

Met Phe Pro Ala Ser Ala Tyr Val Ala Asp Leu Pro Leu Leu Tyr Asn
370 375 380

Lys Thr Tyr Ser Ala Cys Asn Ser Thr Arg Leu Leu Ser Gln Leu Arg
385 390 395 400

Thr Asp Ala Ile Ile Val Cys Glu Glu Ala Glu Asp Ser Val Ser Glu
405 410 415

Gln Ile Ser Val Val Ser Ala Ser Asn Ile Arg Gly Ala Ile Phe Val
420 425 430

Ser Asp Tyr Asp Ala Glu Leu Phe Glu Leu Gly Gly Val Thr Ile Pro

435

440

445

Gly Val Val Ile Ser Thr Lys Asp Ala Pro Ala Val Ile Ser Tyr Ala

450

455

460

Ser Asn Asp Val Lys Pro Lys Ala Ser Ile Lys Phe Gln Gln Thr Val

465

470

475

480

Leu Gly Thr Lys Pro Ala Pro Ala Val Ala Phe Tyr Thr Ser Arg Gly

485

490

495

Pro Ser Pro Ser Tyr Pro Gly Ile Leu Lys Pro Asp Ile Met Ala Pro

500

505

510

Gly Ser Leu Val Phe Ala Ala Trp Ile Pro Asn Thr Ala Thr Ala Gln

515

520

525

Ile Gly Leu Asn Thr Leu Leu Thr Ser Glu Tyr Asn Met Val Ser Gly

530

535

540

Thr Ser Met Ala Cys Pro His Ala Ala Gly Val Ala Ala Leu Leu Lys

545	550	555	560
Gly Ala His Pro Glu Trp Ser Ala Ala Ala Ile Arg Ser Ala Met Met			
	565	570	575
Thr Thr Ala Asn Pro Leu Asp Asn Thr Leu Asn Pro Ile Arg Asp Asn			
	580	585	590
Gly Leu Ile Asn Phe Thr Ser Ala Ser Pro Leu Ala Met Gly Ala Gly			
	595	600	605
Gln Val Asp Pro Asn Arg Ala Leu Asp Pro Gly Leu Ile Tyr Glu Thr			
	610	615	620
Thr Pro Gln Asp Tyr Val Ser Leu Leu Cys Thr Leu Asn Phe Thr Gln			
625	630	635	640
Asn Gln Ile Leu Ser Ile Thr Arg Ser Asn Arg Tyr Ser Cys Ser Thr			
	645	650	655
Pro Asn Pro Asp Leu Asn Tyr Pro Ser Phe Ile Thr Leu His Tyr Asn			
	660	665	670

Thr Asn Ala Thr Phe Val Gln Thr Phe His Arg Thr Val Thr Asn Val

675

680

685

Gly Gly Ser Ala Thr Thr Tyr Lys Ala Lys Ile Thr Ala Pro Leu Gly

690

695

700

Ser Val Val Ser Val Ser Pro Asp Thr Leu Ala Phe Arg Lys Gln Tyr

705

710

715

720

Glu Gln Gln Ser Tyr Glu Leu Thr Ile Glu Tyr Lys Pro Asp Gly Glu

725

730

735

Glu Thr Val Ser Phe Gly Glu Leu Val Trp Ile Glu Glu Asn Gly Asn

740

745

750

His Thr Val Arg Ser Pro Ile Thr Val Ser Pro Ser Met Ser Asn Phe

755

760

765

Val Phe Met Gly Thr Gln

770

<210> 11

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amorce pour produits d'ADNc spécifiques 5'

<400> 11

gggggatccg aggtctagga atggtgttct tca
33

<210> 12

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amorce pour produits d'ADNc spécifiques 3'

<400> 12

gggctcgagt tgtgtaccca taaacacaaa gttactcatg g
41

<210> 13

<211> 2338

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ADNc codant pour l'hétérocarpine ayant subi une délétion
du codon
initiateur et une délétion du codon STOP

<400> 13

gggggatccg aggtctagga atggtgttct tcatttattc cttttcgttc ttgcatgg
ct 60

tctgttggcg gctctccatg ctaactcaag ttcggatgag agatcaacat atatagtt
ca 120

tatggacaag acccatatgc ccaaaacctt ctctagcccc caccattggg actcttcg
gt 180

cgttcgatcc ctcaagtcta caaagccaac caaattaaat cgccgtcgat cctcacca
ct 240

tcttgtatac tcttacgaca atgctgctca tggtttcagt gcagttttat ctcaacag
ga 300

acttgaaact ctaaaaaagt ctccagggtt cgtctcagtt tatgccgata agacagcg
ac 360

acttgacacc acccatacac ctgaatttct ctccctgaat actgccaaag ggttgtgg
cc 420

tgcttcaaag tatggtgaag atataattgt tgggtgttatt gacagcggtg tctggccg
ga 480

gagtgaaagt tataatgatg atggtatggg cgctattcca agcagatgga agggagaa
tg 540

tgaagctgga caagagttca attcctccat gtgcaactca aagcttattg gagctaga
ta 600

tttcgataag ggtatcattg cggcaaattc tgggattaac attagcatga aatctgcc
ag 660

agatactatg gggcatggga ctcacacatc ctccacagtt gctgggaatt atgtggat
gg 720

cgtttcattc tttggctatg ctaaagggtac agcaaaagga gtggcaccac gggcgaga
gt 780

ggctatgtac aagggtcattt ttgacgaagg gcgctatgca tctgatgttc ttgccggt
at 840

ggacgcggct attgctgatg gtgttgatgt aatttcaata tcaatgggat ttgatgag
ac 900

cccgttgat gaagatccta tagcaattgc ctcatcgcct gctacagaga agggcgta
gt 960

ggtctcatct tcagcaggaa atgcagggcc agcgctaggg agcttgcaca atggaatc
cc 1020

atggacgtta actggtgcag ctggaaccat tgaccgttca tttgcaggca ctataact
ct 1080

tgggagtggg gaaaccatca ttggatggac aatgttccca gccagtgctt atgtagca
ga 1140

cttgccactg ctttataaca agacttactc tgcattgcaac tcaactcgat tattatct
ca 1200

actccgaact gacgccatca tcgtatgcga agaagctgaa gattcgggtat ctgagcaa
at 1260

atctgttgct agtgcacgca acattcgggg agccatattt gtttcagatt atgatgct
ga 1320

attatttgaa cttggtggtg tgactattcc tgggtgctg attagcacca aggatgca
cc 1380

ggctgtgatc agctacgcca gcaatgatgt gaaacctaag gcaagcatca agttccaa
ca 1440

aactgttctg ggcacaaagc ctgcaccagc cgtggcttcc tatacttcta gaggtccg
tc 1500

accgagctat ccaggcatct taaagccaga tataatggcc cctgggtcac tagttttt
gc 1560

tgcttggtt ccaaatactg ctacagccca aattgggttg aataccctct tgacaagt
ga 1620

atacaatatg gtttctggaa catcaatggc ctgccctcat gctgctggtg tagctgct
ct 1680

ccttaagggc gcacaccctg aatggagtgc agctgctatt aggtctgcaa tgatgact
ac 1740

agcaaattcc ttggataaca cactaaatcc aatccgggac aatgggtctaa tcaatttc
ac 1800

atctgcttca ccttttagcta tgggagccgg ccaagttgat cctaatacggg cacttgat
cc 1860

tggtttgatt tatgaaacca cccacaaga ttatgtgagc ctctctgca ctctgaac
tt 1920

cacccaaaac caaatcctgt ccattacaag atcaaaccgt tacagctgct ccaccct
aa 1980

tctgatctt aactatcctt cttttattac ttacactac aacacaaatg caacattt
gt 2040

tcagactttt cacaggactg tgactaacgt tggaggaagc gctacaactt acaaggcc
aa 2100

gatcactgct cctctagggt ctgtagttag tgtctcacca gacacattgg ccttcaga

aa 2160

gcagtatgag cagcagagct acgagctcac tattgagtac aagcctgatg gtgaagaa
ac 2220

tgtttcattt ggggaacttg tttggattga agaaaatggg aatcacactg tgaggagc
cc 2280

tattacagtg tcaccttcca tgagtaactt tgtgtttatg ggtacacaac tcgagccc
2338

<210> 14

<211> 793

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hétérocarpine recombinante

<400> 14

Met Ala Ile Ser Arg Glu Leu Val Asp Pro Arg Ser Arg Asn Gly Val

1 5 10 15

Leu His Leu Phe Leu Phe Val Leu Ala Trp Leu Leu Leu Ala Ala Leu

20 25 30

His Ala Asn Ser Ser Ser Asp Glu Arg Ser Thr Tyr Ile Val His Met

35 40 45

Asp Lys Thr His Met Pro Lys Thr Phe Ser Ser Pro His His Trp Tyr

50 55 60

Ser Ser Val Val Arg Ser Leu Lys Ser Thr Lys Pro Thr Lys Leu Asn
65 70 75 80

Arg Arg Arg Ser Ser Pro Leu Leu Val Tyr Ser Tyr Asp Asn Ala Ala
85 90 95

His Gly Phe Ser Ala Val Leu Ser Gln Gln Glu Leu Glu Thr Leu Lys
100 105 110

Lys Ser Pro Gly Phe Val Ser Val Tyr Ala Asp Lys Thr Ala Thr Leu
115 120 125

Asp Thr Thr His Thr Pro Glu Phe Leu Ser Leu Asn Thr Ala Asn Gly
130 135 140

Leu Trp Pro Ala Ser Lys Tyr Gly Glu Asp Ile Ile Val Gly Val Ile
145 150 155 160

Asp Ser Gly Val Trp Pro Glu Ser Glu Ser Tyr Asn Asp Asp Gly Met
165 170 175

Gly Ala Ile Pro Ser Arg Trp Lys Gly Glu Cys Glu Ala Gly Gln Glu
180 185 190

Phe Asn Ser Ser Met Cys Asn Ser Lys Leu Ile Gly Ala Arg Tyr Phe

195

200

205

Asp Lys Gly Ile Ile Ala Ala Asn Pro Gly Ile Asn Ile Ser Met Lys

210

215

220

Ser Ala Arg Asp Thr Met Gly His Gly Thr His Thr Ser Ser Thr Val

225

230

235

240

Ala Gly Asn Tyr Val Asp Gly Val Ser Phe Phe Gly Tyr Ala Lys Gly

245

250

255

Thr Ala Lys Gly Val Ala Pro Arg Ala Arg Val Ala Met Tyr Lys Val

260

265

270

Ile Phe Asp Glu Gly Arg Tyr Ala Ser Asp Val Leu Ala Gly Met Asp

275

280

285

Ala Ala Ile Ala Asp Gly Val Asp Val Ile Ser Ile Ser Met Gly Phe

290

295

300

Asp Glu Thr Pro Leu Tyr Glu Asp Pro Ile Ala Ile Ala Ser Phe Ala

305	310	315	320
Ala Thr Glu Lys Gly Val Val Val Ser Ser Ser Ala Gly Asn Ala Gly			
	325	330	335
Pro Ala Leu Gly Ser Leu His Asn Gly Ile Pro Trp Thr Leu Thr Val			
	340	345	350
Ala Ala Gly Thr Ile Asp Arg Ser Phe Ala Gly Thr Ile Thr Leu Gly			
	355	360	365
Ser Gly Glu Thr Ile Ile Gly Trp Thr Met Phe Pro Ala Ser Ala Tyr			
	370	375	380
Val Ala Asp Leu Pro Leu Leu Tyr Asn Lys Thr Tyr Ser Ala Cys Asn			
	385	390	395
Ser Thr Arg Leu Leu Ser Gln Leu Arg Thr Asp Ala Ile Ile Val Cys			
	405	410	415
Glu Glu Ala Glu Asp Ser Val Ser Glu Gln Ile Ser Val Val Ser Ala			
	420	425	430

Ser Asn Ile Arg Gly Ala Ile Phe Val Ser Asp Tyr Asp Ala Glu Leu
 435 440 445

Phe Glu Leu Gly Gly Val Thr Ile Pro Gly Val Val Ile Ser Thr Lys
 450 455 460

Asp Ala Pro Ala Val Ile Ser Tyr Ala Ser Asn Asp Val Lys Pro Lys
 465 470 475 480

Ala Ser Ile Lys Phe Gln Gln Thr Val Leu Gly Thr Lys Pro Ala Pro
 485 490 495

Ala Val Ala Phe Tyr Thr Ser Arg Gly Pro Ser Pro Ser Tyr Pro Gly
 500 505 510

Ile Leu Lys Pro Asp Ile Met Ala Pro Gly Ser Leu Val Phe Ala Ala
 515 520 525

Trp Ile Pro Asn Thr Ala Thr Ala Gln Ile Gly Leu Asn Thr Leu Leu
 530 535 540

Thr Ser Glu Tyr Asn Met Val Ser Gly Thr Ser Met Ala Cys Pro His
 545 550 555 560

Ala Ala Gly Val Ala Ala Leu Leu Lys Gly Ala His Pro Glu Trp Ser
 565 570 575

Ala Ala Ala Ile Arg Ser Ala Met Met Thr Thr Ala Asn Pro Leu Asp
 580 585 590

Asn Thr Leu Asn Pro Ile Arg Asp Asn Gly Leu Ile Asn Phe Thr Ser
 595 600 605

Ala Ser Pro Leu Ala Met Gly Ala Gly Gln Val Asp Pro Asn Arg Ala
 610 615 620

Leu Asp Pro Gly Leu Ile Tyr Glu Thr Thr Pro Gln Asp Tyr Val Ser
 625 630 635 640

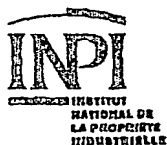
Leu Leu Cys Thr Leu Asn Phe Thr Gln Asn Gln Ile Leu Ser Ile Thr
 645 650 655

Arg Ser Asn Arg Tyr Ser Cys Ser Thr Pro Asn Pro Asp Leu Asn Tyr
 660 665 670

Pro Ser Phe Ile Thr Leu His Tyr Asn Thr Asn Ala Thr Phe Val Gln

675	680	685
Thr Phe His Arg Thr Val Thr Asn Val Gly Gly Ser Ala Thr Thr Tyr		
690	695	700
Lys Ala Lys Ile Thr Ala Pro Leu Gly Ser Val Val Ser Val Ser Pro		
705	710	715
		720
Asp Thr Leu Ala Phe Arg Lys Gln Tyr Glu Gln Gln Ser Tyr Glu Leu		
725	730	735
Thr Ile Glu Tyr Lys Pro Asp Gly Glu Glu Thr Val Ser Phe Gly Glu		
740	745	750
Leu Val Trp Ile Glu Glu Asn Gly Asn His Thr Val Arg Ser Pro Ile		
755	760	765
Thr Val Ser Pro Ser Met Ser Asn Phe Val Phe Met Gly Thr Gln Leu		
770	775	780
Glu His His His His His His His His		
785	790	

reçue le 13/01/03



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11 235*02

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 1.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260399

Vos références pour ce dossier (facultatif)		RS 331 - ER/MM	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		021/163	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
Procédé de préparation d'hétérocarpine recombinante			
LE(S) DEMANDEUR(S) :			
SOCIETE DE CONSEILS DE RECHERCHES ET D'APPLICATIONS SCIENTIFIQUES (S.C.R.A.S.) 42 rue du Docteur Blanche 75016 PARIS FRANCE			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		FERRANDIS	
Prénoms		Eric	
Adresse	Rue	74 avenue Guy de Coubertin	
	Code postal et ville	78470	SAINT REMY LES CHEVREUSE
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Paris, le 5 décembre 2002			
André BOURGOUIN, Mandataire			

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

PCT Application
PCT/FR2003/003629

